

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JERCA ISKRA

**VREDNOTENJE STABILNOSTI LIPOFILNIH VITAMINOV Z
NOVO STABILNOSTNO INDIKATIVNO METODO**

**EVALUATION OF STABILITY OF LIPOPHILIC VITAMINS BY
A NEW STABILITY INDICATING METHOD**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

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

Zahvala

Najlepše se zahvaljujem svojemu mentorju,izr. prof. dr. Robertu Roškarju, mag. farm., za vodenje pri raziskovalnem delu, strokovno pomoč, nasvete in spodbudo. Iskrena zahvala gre tudi Žane Temovi, mladi raziskovalki Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko, za vso pomoč pri praktičnem delu in izdelavi magistrske naloge.

Zahvaljujem se vsem svojim najbližjim za spodbudo pri študiju in pomoč pri nastanku magistrske naloge, še posebno očetu Jožetu Iskri za lektorstvo in fantu Gregorju za pomoč pri oblikovanju. Prav tako se fantu in najbližjim prijateljicam zahvaljujem za čudovita študentska leta, poleg tega pa Luciji še za vse nasvete in podporo, Špeli za pregled angleškega povzetka ter Neji za tiskanje in vezavo.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvomizr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Jerca Iskra

Predsednik komisije:

prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Član komisije:

doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

Ljubljana, 2016

VSEBINA

VSEBINA.....	iii
POVZETEK	vii
ABSTRACT	viii
SEZNAM OKRAJŠAV	ix
1. UVOD.....	1
1.1 VITAMIN A (retinol)	1
1.1.1 Funkcija.....	2
1.1.2 Dnevni odmerek	2
1.1.3 Pomanjkanje	2
1.1.4 Toksičnost	2
1.2 VITAMIN E (α -tokoferol)	3
1.2.1 Funkcija.....	3
1.2.2 Dnevni odmerek	3
1.2.3 Pomanjkanje	4
1.3 VITAMIN D ₃ (holekalciferol)	4
1.3.1 Funkcija.....	5
1.3.2 Dnevni odmerek	5
1.3.3 Pomanjkanje	5
1.3.4 Toksičnost	5
1.4 VITAMIN K ₁ (filokinon).....	6
1.4.1 Funkcija.....	6
1.4.2 Dnevni odmerek	6
1.4.3 Pomanjkanje	7
1.5 STABILNOST LIPOFILNIH VITAMINOV	7

1.6 MULTIVITAMINSKA PREHRANSKA DOPOLNILA IN ZDRAVILA Z VITAMINI A, D ₃ , E, K ₁	8
1.7 UPORABLJENE METODE HPLC ZA VREDNOTENJE LIPOFILNIH VITAMINOV	12
2. NAMEN DELA	14
3. MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI	15
3.1.1 Reagenti, raztopine in referenčne spojine	15
3.1.2 Naprave in pribor	15
3.2 RAZVOJ ANALIZNE METODE	16
3.2.1 Priprava vzorcev pri razvoju metode	16
3.2.2 Priprava vzorcev za stresne teste.....	16
3.2.3 Razvoj in optimiranje analizne metode.....	17
3.3 VREDNOTENJE ANALIZNE METODE	18
3.3.1 Kromatografski pogoji	18
3.3.2 Priprava vzorcev.....	19
3.3.3 Vrednotenje metode	20
4. EKSPERIMENTALNO DELO STABILNOSTNE ŠTUDIJE	22
4.1 POSAMEZNI VITAMINI.....	22
4.1.1 Topila	22
4.1.2 Različne začetne koncentracije	22
4.1.3 Temperatura in UV-svetloba.....	23
4.1.4 Oksidanti – vodikov peroksid	24
4.1.5 Dodatek askorbinske kilsine.....	24
4.1.6 Dodatek EDTA.....	25
4.1.7 Dodatek EDTA in askorbinske kisline.....	26
4.2 KOMBINACIJE VITAMINOV	26

4.2.1 Topila	26
4.2.2 Različne koncentracije vitamina E	28
4.2.3 Različne koncentracije vitamina K ₁	29
4.2.4 Dodatek EDTA.....	29
4.3. STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV.....	30
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	31
5.1 RAZVOJ ANALIZNE METODE	31
5.2 VREDNOTENJE ANALIZNE METODE	33
5.2.1 Selektivnost	34
5.2.2 Linearnost in območje metode	35
5.2.3 Meja zaznave in meja določitve	36
5.2.4 Znotrajdnevna in meddnevna točnost	36
5.2.5 Znotrajdnevna in meddnevna ponovljivost, ponovljivost injiciranja.....	36
5.2.6 Stabilnost.....	37
5.3. DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA STABILNOST POSAMEZNIH VITAMINOV.....	37
5.3.1 Topila	38
5.3.2 Različne koncentracije	39
5.3.3 Temperatura	40
5.3.4 UV-svetloba	41
5.3.5 Oksidanti – vodikov peroksid	42
5.4 STABILIZACIJA POSAMEZNIH VITAMINOV S STABILIZATORJI.....	43
5.4.1 Dodatek askorbinske kisline.....	44
5.4.2 Dodatek EDTA.....	45
5.4.3 Dodatek EDTA in askorbinske kisline.....	46
5.5 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA STABILNOST PRI KOMBINACIJAH VITAMINOV	47

5.5.1 Posamezna topila.....	48
5.5.2 Različne koncentracije vitamina E.....	51
5.5.3 Različne koncentracije vitamina K ₁	53
5.6 STABILIZACIJA KOMBINACIJ VITAMINOV Z EDTA	54
6. SKLEP	56
7. LITERATURA.....	58

POVZETEK

Vitamini so vrsta organskih spojin z nizko molekulsko maso, ki sodelujejo pri uravnavanju normalnih fizioloških funkcij organizma. Razdelimo jih v dve glavni skupini: vodotopni in v lipidih topni (lipofilni) vitamini. Lipofilni vitamini imajo pomembno vlogo pri stimulaciji sinteze in razgradnje hranil, izboljšujejo delovanje imunskega sistema in zmogljivost za rast. V to skupino spadajo vitamini A, D, E in K. Zaradi pomanjkljivih podatkov o njihovi stabilnosti smo le to hoteli sistematično preučiti. V ta namen smo v raziskovalnem delu magistrske naloge razvili, optimirali in ovrednotili metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti za vrednotenje vitaminov A, D₃, E, K₁, ki je bila podlaga za nadaljnje delo. Validirana metoda je vključevala kolono Gemini C18, 100 × 4,6 mm, mobilno fazo acetonitril in metanol v razmerju 70 : 30 s pretokom 1 mL/min, in valovno dolžino detekcije pri 280 nm. Čas analize je bil krajši od 8 minut. S pomočjo metode smo sistematično preučevali stabilnost posameznih vitaminov v enostavnem mediju, možnosti njihove stabilizacije ter medsebojno učinkovanje vitaminov, ko so v mediju prisotni v različnih kombinacijah. Pri preučevanju stabilnosti posameznih vitaminov smo ugotovili, da so bili vsi vitamini precej stabilni v metanolu, veliko manj pa v vodnih medijih. Za nadaljevanje študije smo kot medij uporabljali vodo MilliQ, zaradi njene kontrolirane kakovosti in zaradi najprimernejše kinetike upada koncentracije vitaminov. Opazovali smo vpliv začetne koncentracije vitaminov, UV-svetlobe, temperature in vodikovega peroksida kot oksidanta. Pri višji začetni koncentraciji je bila stabilnost vseh vitaminov boljša, pri višji temperaturi in na UV-svetlobi pa so bili vitamini manj stabilni. Nepričakovane rezultate smo dobili z vodikovim peroksidom, saj ni zmanjšal stabilnosti vitaminov. Splošno je bil najbolj stabilen vitamin K₁, na katerega je imela večji vpliv le UV-svetloba, najmanj stabilen pa vitamin A. Posamezne vitamine smo v nadaljevanju stabilizirali z dvema antioksidantoma in ugotovili, da je EDTA precej povečala njihovo stabilnost. Na koncu smo pripravili vse kombinacije vitaminov in opazovali njihove interakcije. Ti se namreč v različnih kombinacijah pojavljajo v multivitaminskih pripravkih. Poleg tega je vitamin E antioksidant, zato smo pri različnih koncentracijah opazovali njegov vpliv na druge vitamine. Vsi vitamini so bili v kombinaciji z vitaminom E stabilnejši. Pravzaprav so skoraj vse kombinacije vitaminov nekoliko stabilizirale posamezne vitamine, izrazito pa kombinacije z dodatkom EDTA.

ABSTRACT

Vitamins are organic compounds with a low molecular weight that are involved in the regulation of normal physiological functions of our body. They are divided into two main groups: water-soluble and fat-soluble (lipophilic vitamins) vitamins. Lipophilic vitamins play an important role in the stimulation of synthesis and the degradation of nutrients, improve immune function and growth performance. This group includes vitamins A, D, E and K. Due to lack of information about their stability, we decided to study it systematically. For this purpose we have developed, optimized and validated a method of high performance liquid chromatography for the determination of vitamins A, D₃, E, K₁ which was the basis for further work. The validated method included the column Gemini C18, 100 × 4,6 mm, the mobile phase of acetonitrile and methanol in the ratio 70 : 30 with the flow rate of 1 mL/min, and the common wavelength of detection at 280 nm. The analysis time was less than 8 minutes. With this method, the stability of each vitamin in simple media, possibilities of their stabilization and interactions between them when present in media in different combinations were studied systematically. When examining the stability of individual vitamins we found that all of them were quite stable in methanol and much less in different aqueous media. In the continuation, MilliQ water was used as a media because of its controlled quality and the most appropriate kinetics of decline in vitamin concentration. The impact of the initial concentration of vitamins, UV light, temperature and hydrogen peroxide as an oxidant were observed. At a higher initial concentration the stability of vitamins was greater, but at a higher temperature and exposure to UV light, individual vitamins were less stable. Unexpected results were obtained with hydrogen peroxide which did not decrease the stability of vitamins. In general, vitamin K₁ was the most stable – only UV light had greater impact on it – the least stable was vitamin A. In the continuation, individual vitamins were stabilized with two antioxidants and we noticed that EDTA significantly increased their stability. In the end, all combinations of vitamins were prepared to observe their interactions since these vitamins appear in different combinations in various multivitamin supplements. Moreover, vitamin E is an antioxidant, so its impact on vitamins by altering its concentration was also observed. All vitamins had greater stability in combination with vitamin E. In fact, almost any combination stabilized individual vitamins, and even more significantly, the combination with the addition of EDTA.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACN – acetonitril

AK – askorbinska kislina

DHA – dekozaheksaenojska kislina (ang. docosahexaenoic acid)

DNA – deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)

DRI – referenčna vrednost za vnos hranil (ang. Dietary Reference Intake)

DV – destilirana voda

Ea – aktivacijska energija

EDTA – etilendiamintetraocetna kislina (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)

Gla – γ -karboksiglutamat

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. high performance liquid chromatography)

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

IzPr – izopropanol

k – konstanta

konc. – koncentracija

LDL – lipoproteini nizke gostote (ang. low-density lipoproteins)

LOD – meja zaznave (ang. limit of detection)

LOQ – meja določitve (ang. limit of quantification)

MeOH – metanol

MQ – voda MilliQ (voda, prečiščena s sistemom MilliQ)

mRNA – informacijska ribonukleinska kislina (ang. messenger ribonucleic acid)

NV – navadna voda

R^2 – determinacijski koeficient za linearnost

razt. – raztopina

ref. – referenčen

RSD – relativni standardni odklon (ang. relative standard deviation)

UM – umeritvena premica

UV – ultravijoličen

vit. – vitamin

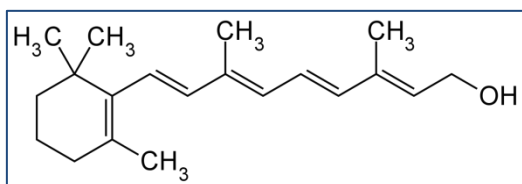
VLDL – lipoproteini zelo nizke gostote (ang. very low-density lipoproteins)

1. UVOD

Vitamini so vrsta organskih spojin z majhno molekulsko maso, ki sodelujejo pri uravnavanju normalnih fizioloških funkcij organizma. So sestavine hrane, ki so nujne za normalno rast ter za vzdrževanje in delovanje človeškega in živalskega telesa. Razdelimo jih v dve glavni skupini: vodotopni in v lipidih topni vitamini (1, 2). Med vodotopne vitamine spadajo vitamini B kompleksa in vitamin C. Ti so dobro topni v vodi in se ne kopičijo v telesu. Izločajo se z urinom, zato je potreben reden, vsakdanji vnos s prehrano. Pod imenom B-kompleks je znanih osem vodotopnih vitaminov: tiamin (B₁), riboflavin (B₂), niacin (B₃), pantotenska kislina (B₅), piridoksin (B₆), biotin (B₇), folna kislina (B₉) in kobalamin (B₁₂) (3). Ti sodelujejo v različnih življenjskih in specifičnih funkcijah pri metabolizmu (2). Razdelimo jih lahko v dve skupini, eni so vključeni v reakcije intermediarnega metabolizma pri energijski proizvodnji in redoksnem statusu, drugi pa so vključeni v prenos posameznih ogljikovih enot. Vitamin C fiziološko deluje kot vodotopen antioksidant z visokim redoksnim potencialom (3, 4). Njegovo antioksidativno delovanje ima pomembno vlogo pri zaščitnih mehanizmih v celicah in tkivih (5). Vodotopni vitamini lahko zaradi nestabilnosti hitro izgubijo svojo aktivnost, se uničijo ali pa izperejo med shranjevanjem in pripravljanjem hrane (3).

V lipidih topni (lipofilni) vitamini se ponavadi absorbirajo v obliki hilomikronov (3). Imajo pomembno vlogo pri stimulaciji sinteze in razgradnje hranil, izboljšujejo delovanje imunskega sistema in zmogljivost za rast (1). V to skupino spadajo vitamini A, D, E in K. Sodelujejo tudi pri preprečevanju nastanka raka, krvožilnih bolezni, pri koagulaciji (L-karboksilacija inaktiviranih faktorjev strjevanja) in kalcifikaciji v kosteh. So koristni klinični pokazatelji pojavnosti raka, miokardnega infarkta, hemoragije in osteomalacije (6). Pri pomanjkanju vitaminov se lahko razvijejo različne bolezni. Prav tako pa lahko tudi preveliko uživanje vitaminov povzroči zastrupitve (1).

1.1 VITAMIN A (retinol)



Slika 1: Struktura vitamina A

1.1.1 Funkcija

Vitamin A (slika 1) sodeluje pri celični rasti in diferenciacijskih usmeritvah (7) (npr. pomembno vlogo ima pri diferenciaciji in integriteti epitelijskih celic dihalnih poti, posebno pri epiteliju alveolov v pljučih (8)). Vključen je v vidni cikel, imunski odgovor in gensko ekspresijo med razvojem zarodka. Stopnje v vidnem ciklu so izomerizacija v 11-cis-retinol, ki se prenaša z interofotoreceptorskim vezavnim proteinom do zunanega segmenta paličic, encimska pretvorba do 11-cis-retinala in tvorba rodopsina iz opsina in 11-cis-retinala (7). Sodelovanje vitamina A pri imunskem odgovoru vključuje sodelovanje pri delovanju T-celic pomagalk in naravnih celic ubijalk (9). V telesu se večina vitamina A shranjuje v jetrih. Glavni fiziološki prenašalec za njegovo dostavljanje po krvi drugim organom je vezavni protein za retinol. Zagotavlja dobro urejen transportni sistem, ki pomeni evolucijsko prednost vretenčarjev, saj so se sposobni prilagoditi nihanju vitamina A v naravnem okolju. Izguba tega proteina je pri miših povzročila izredno občutljivost za pomanjkanje vitamina A, saj shranjevanje vitamina v jetrih ni bilo več aktivirano (10).

1.1.2 Dnevni odmerek

Referenčna vrednost za vnos hranil (DRI) vitamina A (vseh trans-retinolo) je za dojenčke do 6 mesecev 400 µg na dan, od 7 do 12 mesecev pa 500 µg na dan, za otroke od 1 do 3 let 300 µg na dan, od 4 do 8 let 400 µg na dan, od 9 do 13 let 600 µg na dan, za odrasle ženske 700 µg na dan, za odrasle moške 900 µg na dan, za matere, ki dojijo, pa 1300 µg na dan. Največji dnevni odmerek je 3000 µg na dan (9).

1.1.3 Pomanjkanje

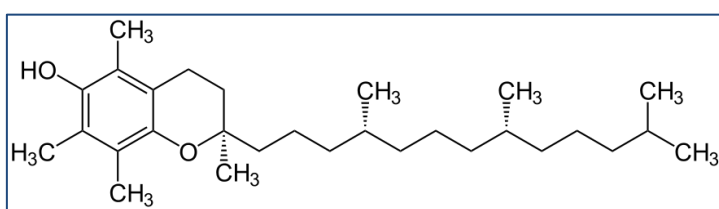
Pomanjkanje vitamina A se kaže v spremembah v tkivu oči, kar lahko vodi do slepote. Pojavijo se simptomi, ki vključujejo nočno slepoto (nesposobnost videnja pri šibki svetlobi), konjunktivalno in kornealno kserozo in razjede ter brazgotine roženice, ki lahko vodijo do izgube vida. S skupnim imenom jih imenujemo kseroftalmija (11). Drugi simptomi so poškodbe kože, izguba teka, epitelijska keratinizacija, počasnejša rast in večja dovzetnost za okužbe (9).

1.1.4 Toksičnost

Do hipervitaminoze lahko pride zaradi čezmernega vnosa hrane, bogate z vitaminom A, ali prevelikega odmerka prehranskih dopolnil (9). Toksičnost retinola lahko razdelimo na

akutno, kronično in teratogeno (7). Simptomi akutne toksičnosti so slabost, bruhanje, glavobol, povišan cerebrospinalni tekočinski tlak, vrtoglavica, zamegljen vid, motnja mišične koordinacije in izbuljene fontanele pri dojenčkih. Povzroči jih lahko enkratni odmerek večji od 200 mg. Kronična toksičnost se pojavi pri uživanju odmerkov, ki so večji od 30 mg na dan, več mesecev ali let (11). Simptomi vključujejo ataksijo, alopecijo, nepravilnosti na jetrih, kostne in kožne spremembe, motnje vida in učinke na živčni sistem (7, 11). Večina simptomov izzveni, ko se zmanjša uživanje vitamina A. Uživanje odmerkov od 30 do 90 mg dalj časa lahko vodi v teratogenost (7).

1.2 VITAMIN E (α -tokoferol)



Slika 2: Struktura vitamina E

1.2.1 Funkcija

Vitamin E (slika 2) je primaren lipofilen antioksidant v sistemu sesalcev. Uravnotežena prehrana, ki zagotavlja dovolj vitamina E in drugih rastlinskih antioksidantov, je nepogrešljiva za zdravje in zagotavlja kvalitetnejše življenje. Sprejeto dejstvo je, da oksidativna okvara na celičnem nivoju lahko povzroči nastanek kroničnih bolezni (6). Antioksidanti in z njimi tudi vitamin E učinkujejo tako, da lahko preprečijo različne vrste raka, krvožilne bolezni in katarakte (12). Študije kažejo, da je težko ločiti specifične učinke vitamina E od učinka drugih antioksidantov iz prehrane. Obstajajo trdni dokazi, da antioksidantne hranilne snovi preprečujejo razvoj krvožilnih bolezni (9). Vitamina E, C in β -karoteni zmanjšujejo dovzetnost lipoproteinov nizke gostote (LDL) za oksidacijo; oksidirani LDL so lahko začetniki ateroskleroze (13). Vitamin E je naveden kot najbolj učinkovit antioksidant pri preprečevanju oksidacije LDL (9).

1.2.2 Dnevni odmerek

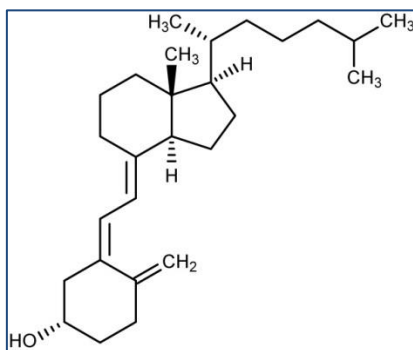
Prehranska referenčna vrednost za vnos hranil je 15 mg α -tokoferolov na dan za odrasle moške in odrasle ženske, prav tako tudi za doječe matere in nosečnice. Za dojenčke, stare do 6 mesecev, je DRI 4 mg na dan, za tiste od 7 do 12 mesecev 6 mg na dan, za otroke,

stare od 1 do 3 let, 6 mg na dan, od 4 do 8 let 7 mg na dan in od 9 do 13 let 11 mg na dan. Največji dnevni odmerek za odrasle je 1000 mg na dan (9).

1.2.3 Pomanjkanje

Do pomanjkanja vitamina E lahko pride zaradi različnih stanj, ki vplivajo na absorpcijo maščob ali samega vitamina. Do malabsorpcije lahko pride zaradi nepravilnosti v delovanju trebušne slinavke ali jeter, ki povzročijo zmanjšano maščobno absorpcijo, ali zaradi nepravilnosti črevesnih celic, dolžine črevesja in okvare v sintezi ali sestavljanju hilomikronov (9). Genske nepravilnosti pri metabolizmu lipoproteinov, ki proizvajajo hilomikrone, lipoproteine z nizko gostoto (LDL) in z zelo nizko gostoto (VLDL), vplivajo tako na absorpcijo kot na transport vitamina E (14). Genske spremembe v genu prenašalnega proteina za α -tokoferol so povezane s sindromom ataksije s pomanjkanjem vitamina E, ki se kaže v živčnih nepravilnostih (15). Periferna nevropatija je prvi znak pomanjkanja, ki se pojavi pri človeku (16). Pride pa lahko tudi do zmanjšane energijske proizvodnje v mitohondrijih, mutacije deoksiribonukleinske kisline (DNA) in spremembe v mehanizmu transporta plazemske membrane, do motenj razmnoževanja, mišičnih, jetrnih nepravilnosti, nepravilnosti kostnega mozga in možganskih funkcij ter do motnje v kapilarni prepustnosti. Začetni simptomi so pri človeku tudi blaga hemolitična anemija z zvišano eritrocitno hemolizo in spinocerebralne bolezni, predvsem pri otrocih, ki imajo maščobno malabsorpcijo. Simptomi napredovelega pomanjkanja vitamina E so hiporefleksija, ataksija, škilasto oko, omejitev pogleda navzgor, mišična šibkost, zoženje vidnega polja in centrocekalni skotom (temne pikice v očeh) (9).

1.3 VITAMIN D₃ (holekalciferol)



Slika 3: Struktura vitamina D₃

1.3.1 Funkcija

Aktivna oblika vitamina D₃ nastane po vnosu v naše telo (slika 3 prikazuje nekativno obliko). 25-hidroksivitamin D₃ se tvori v jetrih, primarno metabolično aktivna oblika pa nastane v ledvicah, to je 1 α ,25-dihidroksivitamin D₃ (9). Aktivna oblika se nato prenese do tarčnih organov, kjer se veže na receptorje in s tem spremeni hitrost transkripcije tarčnih genov, ki skrbijo za biološki odziv (17). Biološki odzivi vključujejo mobilizacijo kalcija in fosforja iz kosti, absorpcijo kalcija in fosforja v črevesju in reabsorpcijo kalcija in fosforja v ledvicah. Preostale vloge vitamina D₃ so nastanek osteoblastov, razvoj zarodka, sodelovanje pri funkciji trebušne slinavke, živčevja, imunosti in z 1 α ,25-dihidroksivitaminom D₃ uravnavana celična rast ter diferenciacijski učinki (9). Poleg vnosa s hrano se pri izpostavljenosti sončni svetlobi vitamin D₃ tvori tudi v naši koži iz 7-dehidroholesterolu (18).

1.3.2 Dnevni odmerek

Prehranska referenčna vrednost za vnos hranil vitamina D je 5 μ g na dan za dojenčke, otroke in odrasle do 50. leta starosti, prav tako pa za nosečnice in doječe matere. Odrasli med 50. in 70. letom lahko na dan zaužijejo 10 μ g, starejši od 70 let pa 15 μ g. Največji dnevni odmerek za dojenčke do 1. leta starosti je 25 μ g, za druge pa 50 μ g na dan (9).

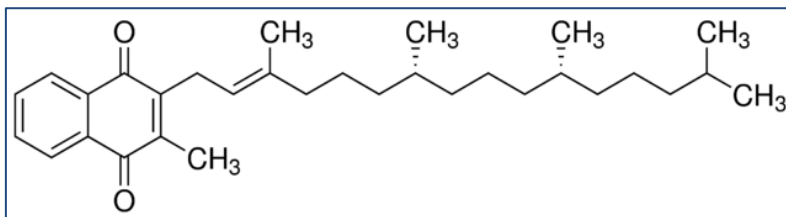
1.3.3 Pomanjkanje

Pomanjkanje vitamina D lahko pri dojenčkih in otrocih privede do rahitisa, pri odraslih pa do osteomalacije. Do pomanjkanja pride zaradi premajhnega vnosa vitamina ali zaradi premajhne izpostavljenosti sončni svetlobi, kar pa se da odpraviti z dodajanjem vitamina D, razen pri rahitisu, odpornem na vitamin D. Pri starejših je pomanjkanje pogostejše, simptomi pa se kažejo v mišičnih bolečinah, debelosti, mišični šibkosti in motnjah pri hoji (19, 20).

1.3.4 Toksičnost

Hipervitaminoza vitamina D vodi do povečanja koncentracije 25-hidroksivitamina D₃ v serumu, kar je tudi diagnostični indikator za zastrupitev z vitaminom D. Zaradi povečane absorpcije kalcija in spodbujanja resorpcije kosti pride do hiperkalcemije (21) in lahko tudi do hiperkalcemije, nereverzibilnih ledvičnih in krvožilnih poškodb, anoreksije, bruhanja, žeje, mišične šibkosti, bolečin v sklepih in dezorientacije (9).

1.4 VITAMIN K₁ (filokinon)



Slika 4: Struktura vitamina K₁

1.4.1 Funkcija

Vitamin K (slika 4 prikazuje obliko K₁) je kofaktor za karboksilazo, odvisno od vitamina K, in je potreben za posttranslacijsko pretvorbo glutamata in glutaminske kisline v γ -karboksiglutamat (Gla) (22, 23). Poleg tega pa lahko vitamin K₂ tudi neposredno spodbudi nastajanje informacijske ribonukleinske kisline (mRNA) v mRNA označevalcih osteoblastov in uravnava transkripcijo kostno specifičnih genov (24). Za proteine, odvisne od vitamina K, pretvorba glutamata v Gla omogoči vezavo kalcijevih ionov in je nujna za biološko aktivnost (22). Znani so številni proteini, odvisni od vitamina K, ali taki, ki vsebujejo Gla. Med te spadajo koagulacijski proteini v krvi, ki so sestavljeni iz protrombina (faktorji II, VII, IX, X in proteini C, S, Z). Trije proteini, odvisni od vitamina K, to so osteokalcin, matriksni protein Gla in protein S, so komponente kostnega matriksa. Identificirano je bilo še veliko drugih proteinov Gla, katerih vloga še ni natančno znana (9). Vloge vitamina K, za katere obstajajo znanstveni dokazi, so zaviranje kalcifikacije, zaviranje celične apoptoze in proliferacije, normalno strjevanje krvi, signalna transdukcija, fagocitoza in transkripcijska regulacija kostno specifičnih genov (9, 25, 26).

1.4.2 Dnevni odmerek

Prehranska referenčna vrednost za vnos hranil je za dojenčke, stare do 6 mesecev, 2 μg na dan, 2,5 μg na dan pa za dojenčke, stare od 7 do 12 mesecev. Za otroke, stare od 1 do 3 let, je dnevni odmerek 30 μg , za otroke od 4 do 8 let 55 μg , za dekleta in fante od 9 do 13 let 60 μg na dan, za mladostnike od 14 do 18 let pa 75 μg na dan. Za moške, starejše od 18 let, je DRI 120 μg , za ženske, starejše od 18 let, doječe matere in nosečnice pa 90 μg . Največji dnevni odmerek ni definiran, saj še ni bilo objavljenih nobenih neželenih učinkov pri večjih odmerkih (9).

1.4.3 Pomanjkanje

Pomanjkanje vitamina K se največkrat pojavi pri novorojenčkih. Do njega pride zaradi slabega prehoda vitamina skozi posteljico, odsotnosti bakterijske sinteze v novorojenčkovem črevesju, nizke plazemske koncentracije faktorjev strjevanja in nizke vsebnosti vitamina K v materinem mleku (9). Pomanjkanje privede do hemoragije, saj nizka plazemska koncentracija protrombina zaradi pomanjkanja biosinteze v jetrnih celicah povzroči krvavenje v koži, podkožnem tkivu, gastrointestinalnem traktu in intrakranialne krvavitve. Pride do poškodbe centralnega živčnega sistema, tako da je pomanjkanje pogosto usodno (27). Pomanjkanje pri odraslih je redko. Če se pojavi, je definirano kot »na vitamin K odzivna hipoprotrombinemija«. Do nje privedejo sindrom malabsorpcije maščob, jetrne bolezni, antibiotična terapija, ki zavira mikrobnno sintezo vitamina K₂ v črevesju (9). Ker so trije proteini odvisni od vitamina K (osteokalcin, matriksni protein Gla, protein S) v kosteh in sodelujejo pri kostnem metabolizmu, imajo lahko zaradi spremenjene funkcije škodljive posledice za okostje. Po nekaterih podatkih lahko manj izraženo pomanjkanje vitamina K vodi do razvoja osteoporoze, vendar ni zanesljivo ali nizka vsebnost vitamina K res prispeva k izgubi kostne gostote (22).

1.5 STABILNOST LIPOFILNIH VITAMINOV

Lipofilni vitamini so v splošnem precej nestabilni – podrobnejši pregled literarnih podatkov je zbran v preglednici I. Občutljivi so na kisik, svetlobo in temperaturo. Glavni razlog za to je njihova struktura s konjugiranimi dvojnimi vezmi (28). Vitamin E je naravni antioksidant in zato v različnih maščobnih sistemih interagira z nenasičenimi maščobnimi kislinami, ki so podvržene oksidaciji. Pri vitaminu D₃ pride v kislem okolju in na svetlobi do izomerizacije in nastanka 5,6-trans-izomera in izotahisterola, prav tako pride na svetlobi do izomerizacije pri vitaminu A, in sicer se tvori cis-izomer (9).

Preglednica I: Stabilnost analiziranih vitaminov iz literarnih podatkov

	Vitamin A	Vitamin E	Vitamin D ₃	Vitamin K ₁
Oksidativna stabilnost	zelo nestabilen, stabilizacija z antioksidanti: butilhidroksitoluen, pirogolol, askorbil palmitat, tokoferol (9, 29)	dokaj nestabilen, reakcija je pospešena s svetlobo, bazičnim pH, povišano T, kovinskimi ioni (npr. Fe ²⁺), lipooksidazno reakcijo (9, 30)	dokaj nestabilen (vendar bolj stabilen kot vitamina E in A) (9)	dokaj stabilen (9)

Fotostabilnost	nestabilen na svetlobi (tvorba cis-izomera) (9,29)	na svetlobi pospešena oksidacija (9, 31)	nestabilen na svetlobi (izomerizacija) (9, 32)	nestabilen na svetlobi (9)
Stabilnost v bazičnem pH	relativno stabilen, a lahko pride do katalizirane izomerizacije (9)	stabilen ob odsotnosti kisika (9)	dokaj stabilen (9)	nestabilen (9)
Stabilnost v kislem pH	nestabilen (9)	nismo našli podatka	nestabilen (izomerizacija) (9)	nismo našli podatka
Temperaturna stabilnost	pri visoki T pride do izomerizacije, ne shranjevati nad 40 °C (9, 29)	stabilen ob odsotnosti kisika (9, 30)	stabilen pri nizkih temperaturah (9)	nestabilen le pri zelo visokih T (9, 33)

1.6 MULTIVITAMINSKA PREHRANSKA DOPOLNILA IN ZDRAVILA Z VITAMINI A, D₃, E, K₁

Obstaja zelo veliko število multivitaminskih pripravkov. Teh je na trgu več kot pripravkov s samo enim vitaminom. So pa posamezni vitamini večkrat prisotni v zdravilih kot v prehranskih dopolnilih. Največkrat se v multivitaminskih prehranskih dopolnilih poleg vitaminov pojavljajo tudi minerali, ponavadi pa vključujejo naslednje vitamine: vitamin A (retinol) v prosti obliki, obliki acetata ali palmitata, β -karoten, vitamin B₁ (tiamin) v obliki mononitrata, B₂ (riboflavin) v prosti obliki, B₃ (niacin) v obliki niacina ali nikotinamida, B₅ (pantotenska kislina) v obliki kalcijevega D-pantotenata, B₆ (piridoksin) v obliki hidroklorida, B₇ (biotin) v prosti obliki, B₉ v oksidirani (folna kislina) ali reducirani obliki (folat), B₁₂ (kobolamin) v obliki kobolamina ali cianokobolamina, vitamin C (askorbinska kislina) v prosti obliki ali obliki kalcijevega askorbata dihidrata, vitamin D₃ (holekalciferol) v prosti obliki, vitamin E (tokoferol) v obliki α -tokoferola ali α -tokoferol acetata, včasih pa tudi vitamin K₁ (fitomenadion oz. filokinon) ali vitamin K₂ (menakinon) v prosti obliki. Velikokrat so jim pridruženi tudi drugi antioksidanti ali izvlečki nekaterih rastlin. Prehranska dopolnila proizvajajo številni proizvajalci. Pregledali smo pripravke podjetij Jamieson, Terranova, Natural Wealth, Lekarna Ljubljana, FidiMed, Pharmalife, Now in nekatere druge, ki jih najdemo v lekarnah (preglednica II). Največkrat se od lipofilnih vitaminov v multivitaminskih pripravkih pojavita vitamina D₃ in E, skoraj vedno pa je prisoten tudi vitamin A, medtem ko je vitamin K dodan le redko. Vsi štirje vitamini so v pripravkih Jamieson Vita-Vim za ženske, Vitamini in minerali Lekarne Ljubljana,

multivitamin Terranova za otroke, Supradyn ter FidiVit Multi in multinutrienti Terranova. Pri zadnjih dveh je namesto vitamina K₁ dodan vitamin K₂. Novorojenčki in dojeni dojenčki dobijo manj vitamina K, saj ga je v materinem mleku malo in slabo prehaja čez placento. Do pomanjkanja vitamina K največkrat pride prav pri teh, zato je pomembno, da ga dobijo v dovolj veliki količini. V multivitaminskih pripravkih za odrasle pa je dodan predvsem zaradi njegove vloge pri funkciji kostnega matriksa (9). Novorojenčki in dojeni dojenčki prav tako ne dobijo zadosti vitamina D, ker je tudi tega v materinem mleku malo in ker so manj izpostavljeni sončni svetlobi, ki je glavni naravni vir za njegovo sintezo. Zato ga je treba nadomeščati s prehranskimi dopolnili ali zdravili (34, 35). Poleg prehranskih dopolnil z vitamini je pri nas registriranih in dostopnih tudi kar nekaj zdravil z več ali posamičnimi lipofilnimi vitamini za določene namene (preglednica III). Vitamini se pri zdravilih pojavljajo v enakih oblikah kot pri prehranskih dopolnilih – te so našteje v začetku poglavja.

Preglednica II: Pregled različnih multivitaminskih prehranskih dopolnil

Ime	Vitamini in druge aktivne komponente	Uporaba/Indikacija
naravni multivitamini Jamieson Prenatal	<u>vitamin A</u> , β-karoten, <u>vitamin D₃</u> , C, <u>E</u> , vitamin B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₅ , B ₆ , B ₇ , B ₉ , B ₁₂ , magnezij, baker, krom, jod, mangan, kalcij, cink, železo, acerola, šipek, limonini bioflavonoidi	kompleks vitaminov, mineralov, hranilnih snovi za zdravje matere in dojenčka
Jamieson Vita-Vim za ženske	<u>vitamin A</u> , β-karoten, vitamini B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₇ , B ₉ , B ₁₂ , vitamini C, <u>D₃</u> , <u>E in K</u> , kalcij, železo, magnezij, fosfor, izvleček brokolija, brusnice, kalcijev D-glukarat, naravna D-manoza	prehranska podpora za pomoč pri ohranjanju zdravja žensk
Jamieson Vita-Vim za otroke	vitamin C, β-karoten, vitamini B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₅ , B ₆ , B ₇ , B ₉ , B ₁₂ , <u>E</u> , <u>A</u> , <u>D₃</u> , kalcij, jod, železo, baker	zagotavlja pomembno podporo za pravilno rast in razvoj ter pomaga spodbujati otrokovo zdravje
želežki Jamieson Vita-Vim	vitamini C, B ₃ , B ₆ , B ₇ , B ₉ , B ₁₂ , <u>A</u> , <u>D₃</u> , <u>E</u>	podpora zdravja in razvoja otroka, oskrba z bistvenimi vitamini
ABC Plus (Natural Wealth)	β-karoten, vitamini C, <u>D</u> , <u>E</u> , B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₅ , B ₆ , B ₇ , B ₉ , B ₁₂ , kalcij, železo, jod, fosfor, magnezij, cink, selen, baker, mangan, krom, molibden, kalij, lutein, likopen	za imunski sistem, dodatek k prehrani pri osebah v stresnem stanju, pri starejših osebah, nosečnicah in doječih materah, vegetarijancih...
ABC Plus Junior (Natural Wealth)	β-karoten, vitamini C, <u>D</u> , <u>E</u> , B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₅ , B ₆ , B ₇ , B ₉ , B ₁₂ , železo, mešanica zelenjave,	kot dodatek z najpomembnejšimi vitamini in

	zaščiten mešanica sadja	železom, obogaten z mešanico zelenjave in sadja ter citruskimi bioflavonoidi
Vitamini in minerali (Lekarna Ljubljana)	vitamini C, <u>E</u> , B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₅ , B ₆ , B ₇ , B ₉ , B ₁₂ , <u>A, D, K</u> , kalcij, fosfor, magnezij, cink, železo, mangan, baker, molibden, selen, krom	vitamini in minerali kot prehransko dopolnilo
FidiVit Multi (FidiMed)	β-karoten, vitamini B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₅ , B ₆ , B ₇ , B ₉ , B ₁₂ , C, <u>D₃, K₂</u> , mešani tokotrienoli, baker, cink, fosfor, jod, kalij, krom, magnezij, mangan, molibden, selen, resveratrol	za zmanjšanje utrujenosti in izčrpanosti, krepitev odpornosti, zaščito pred prostimi radikali
multivitamin Terranova za otroke	vitamini <u>A, C, D₃, E, K₁</u> , vitamin B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₅ , B ₆ , B ₇ , B ₉ , B ₁₂ , kalcij, magnezij, DHA, železo, cink, mangan, baker, jod, molibden, selen, krom, kompleks magnifood (izvlečki različnih rastlin)	prehransko dopolnilo v obliki veganskih kapsul za otroke od 4 do 12 let
multinutrienti Terranova	vitamin <u>A, C, D₂, E, K₂</u> , vitamini B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₅ , B ₆ , B ₇ , B ₉ , B ₁₂ , naravni β-karoten, kalcij, cink, holin, magnezij, lutein, likopen, citrusni bioflavonoidi, inozitol, macesnov arabinogalaktan, selen, bor, baker, železo, mangan, α-lipoična kislina, krom, jod, kompleks magnifood (izvlečki različnih rastlin)	multinutrienti za kakovostno življenje
prenatalni multivitaminski kompleks Terranova	vitamin <u>E, D₂</u> , C, B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₅ , B ₆ , B ₇ , B ₉ , B ₁₂ , naravni β-karoten, magnezij, železo, cink, kalcij, bioflavonoidi citrusov, dekozaheksaenojska kislina (DHA), holin, baker, mangan, selen, krom, jod, kompleks magnifood (izvlečki različnih rastlin)	prehransko dopolnilo za jemanje med nosečnostjo in dojenjem
VitaMix Bimbi (Pharmalife)	vitamin B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₅ , B ₆ , B ₉ , B ₁₂ , <u>C, D₃, E</u> , pšenični kalčki, korenček, šipek, β-karoten	primeren pri prehrani otrok v obdobju rasti, zlasti pri pomanjkljivem vnosu sadja in zelenjave
Supradyn Energija Q10	vitamini C, <u>A, E, K, D</u> , B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₅ , B ₆ , B ₇ , B ₉ , B ₁₂ , β-karoten, kalcij, magnezij, železo, cink, koencim Q10, mangan, baker, jod, selen, molibden, krom	kot dopolnilo k vsakdanji uravnoteženi prehrani ohranja energijo in vitalnost ves dan
Multivitamin Now	vitamin <u>A, C, D₃, E</u> , B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₅ , B ₆ , B ₇ , B ₉ , B ₁₂ , kalcij, železo, jod, magnezij, cink, selen, baker, mangan, krom, molibden, lutein, likopen	zagotovljen širok spekter esencialnih hranil s sinergično kombinacijo vitaminov in mineralov

Preglednica III: Pregled registriranih zdravil z lipofilnimi vitamini

Ime	Sestavine	Indikacija
Vitalipid N Infant (36)	<u>vitamin A, K₁, D₂, E</u>	za dojenčke in otroke do 11. leta starosti kot dodatek intravenski prehrani za zadostitev dnevnih potreb po v maščobah topnih vitaminih A, D ₂ , E in K ₁
Vitalipid N Adult (37)	<u>vitamin A, K₁, D₂, E</u>	za otroke od 11. leta naprej in za odrasle kot dodatek intravenski prehrani za zadostitev dnevnih potreb po v maščobah topnih vitaminih A, D ₂ , E in K ₁
Pikovit (38)	<u>vitamin A, D₃</u>, C, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₉, B₁₂, kalcij in fosfor	namenjen predvsem otrokom s pomanjkanjem teka, šolskim otrokom pri preutrujenosti, kot dodatek po zdravljenju z antibiotiki in kot vitaminsko mineralno dopolnilo k hrani
Pikovit forte (39)	<u>vitamin A, D₃</u>, C, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₉, B₁₂, kalcij in fosfor	pri povečani potrebi po vitaminih in kot dodatek nezadostni prehrani pri preutrujenosti in slabi koncentraciji šolskih otrok, pri telesnih obremenitvah, pri enolični prehrani, pri pomanjkanju teka in po zdravljenju z antibiotiki
Makrovit (40)	<u>vitamin A, D₃</u>, C, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₁₂, kalcij in fosfor	pri povečanih potrebah po vitaminih in kot dodatek nezadostni prehrani pri telesnih in umskih preobremenitvah, pri športu, pri nezadostni izrabi hrane, pri neredni, enolični prehrani v obdobju nosečnosti in dojenja
Elevit Pronatal (41)	<u>vitamin A</u>, C, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉, B₁₂, <u>D₃, E</u>, železo, magnezij, mangan, baker, fosfor, cink	za preprečevanje ali zmanjšanje motenj zaradi porušenega ravnovesja ali pomanjkanja vitaminov ali mineralov med nosečnostjo in dojenjem
HypoTears gel za oko (42)	<u>vitamin A</u>	nadomestek solzne tekočine za obvladovanje stanj s suhimi očmi, vključno s keratoconjunctivitis sicca in nestabilno solzno prevleko ali nezadostnim vlaženjem roženice
AD₃ 6000 i.e./2000 i.e (43)	<u>vitamin A</u> in <u>D₃</u>	za preprečevanje hipovitaminoze A in D pri otrocih
Plivit D3 (44)	<u>vitamin D₃</u>	za preprečevanje rahitisa pri dojenčkih in malih otrocih zaradi neustrezne prehrane, za preprečevanje osteoporoze, dodatek vitamina D, ko izpostavljanje sončni svetlobi ni možno, pri nosečnicah in doječih materah

Actonel Combi (45)	<u>vitamin D₃</u> , kalcij, risendronska kislina	za zdravljenje pomenopavzne osteoporoze, za zmanjšanje nevarnosti zlomov vretenc in kolka
Forosa Combo (46)	<u>vitamin D₃</u> , kalcij, alendronska kislina	za zdravljenje osteoporoze po menopavzi, zmanjšanje pogostnosti zlomov hrbtenice in kolka
Kalcij/Vitamin D3 Lek; Kalcipos (47, 48)	<u>vitamin D₃</u> , kalcij	za preprečevanje in zdravljenje pomanjkanja vitamina D in kalcija pri starejših osebah ter kot dodatek za specifično zdravljenje osteoporoze
Konakion (49)	<u>vitamin K₁</u>	za krvavitve zaradi hude hipoprotrombinemije (pomanjkanja koagulacijskih faktorjev II, VII, IX in X), zaradi prevelikega odmerjanja kumarinskih antikoagulantov, kombinacije kumarinov in fenilbutazona ali drugih oblik hipovitaminoze K

1.7 UPORABLJENE METODE HPLC ZA VREDNOTENJE LIPOFILNIH VITAMINOV

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je glavna metoda za vrednotenje vitaminov. Kadar je v pripravkih več vitaminov hkrati, potrebujemo sočasno metodo in HPLC je kot separacijska metoda najbolj primerna. V preglednici IV so zbrane metode, ki so jih raziskovalci uporabili za vrednotenje različnih kombinacij lipofilnih vitaminov. Kot stacionarno fazo so v vseh primerih uporabili reverznofazne kolone C18, ki so se razlikovale le v dimenzijah. Za mobilno fazo pa so najpogosteje uporabili različna razmerja in kombinacije acetonitrila (ACN), metanola (MeOH) in vode (H₂O) s pretokom od 1 do 2 mL/min. V farmakopeji so podane le metode, ki so primerne za vrednotenje enega vitamina (USP, Ph. Eur.). Poleg reverznofazne tekočinske kromatografije obe farmakopeji navajata tudi normalno fazno (50, 51).

Preglednica IV: Pregled metod HPLC za vrednotenje vitaminov iz literaturnih podatkov

Številka metode	Analizirani lipofilni vitamini	Stacionarna faza	Mobilna faza	Pretok (ml/min)	Čas analize (min)	V _{injiciranja} , valovna dolžina
1 (6)	vitamina A in E, metaboliti vitamina D ₃	C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm)	Gradientna elucija – najprej do 70 % MeOH in 30 % ACN/H ₂ O (2 : 3 v/v), nato do MeOH/IzPr 90 : 10, nazadnje do MeOH/IzPr 1 : 1	najprej 0,6, nato 1, nazadnje 1,2	35	325 nm, 291 nm, 265 nm
2 (52)	vitamina A acetat, E acetat	C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm)	100 % ACN	1,8	ni podatka	20 μL, 330, 280 nm
3 (53)	trans-vitamin A, α-, γ-, δ-vitamin E	C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm)	Gradientna elucija – ACN/MeOH 70 : 30 do 100 % MeOH	1, nato 1,2	15	325 nm, 295 nm
4 (54)	vitamin A palmitat, E acetat	C18 (30 x 3,9 mm, 10 μm)	MeOH/ACN 75 : 25	1,5	11	325 nm, 280 nm
5 (2)	vitamin A palmitat, E acetat, D ₃	C18 (150 x 3,9 mm, 4 μm)	MeOH/ACN 95 : 5	2	10	20 μL, 285 nm
6 (55)	vitamini A, D ₃ , E, provitamin D ₂	C18 (150 x 3,9 mm)	100 % MeOH	1,5	6	290 nm
7 (56)	vitamin A palmitat, E acetat, K ₁ (interni standard)	C18 (125 x 4 mm, 5 μm)	100 % MeOH	1,5	11	20 μL, 326 nm, 254 nm
8 (1)	vitamin K ₃ , A acetat, D ₃ , α-vitamin E, α-vitamin E acetat	C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm)	MeOH/H ₂ O 98 : 2	1	16	10 μL, 265 nm, 230 nm
9 (57)	vitamin A, D ₃ , K ₁ , K ₂ , K ₃ , α-, δ-vitamin E α-vitamin E acetat	C18 (150 x 4,6 mm, 3 μm)	Gradientna elucija – MeOH/ACN 50 : 50, do MeOH/ACN 30 : 70	1,3	15	20 μL, 280 nm

2. NAMEN DELA

V zadnjem času se srečujemo s čedalje več prehranskimi dopolnili in zdravili, ki poleg drugih vitaminov in mineralov vsebujejo lipofilne vitamine A, D₃, E in K₁. Za ustrezno načrtovanje prehranskih dopolnil in zdravil je potrebno natančno poznavanje stabilnosti posameznih učinkovin in njihovih medsebojnih interakcij. Znano je, da so lipofilni vitamini manj stabilni – občutljivi so na UV-svetlobo, kisik in temperaturo. Vendar so dostopni podatki pomanjkljivi in si v nekaterih primerih tudi nasprotujoči. Pri prehranskih dopolnilih se redko kontrolira kakovost, zato, in zaradi čedalje več prehranskih dopolnil z različnimi kombinacijami vitaminov, je zaželeno, da bi obstajala dobra, enostavna in hitra metoda za vrednotenje vseh štirih lipofilnih vitaminov hkrati.

V magistrski nalogi bomo najprej razvili analizno metodo, ki bo osnova za nadaljnje delo. Naš cilj je razviti hitro in enostavno metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti za vrednotenje lipofilnih vitaminov A, D₃, E in K₁. Metodo bomo tudi optimirali s stresnimi testi in jo ovrednotili.

V nadaljevanju bomo sistematično preučevali stabilnost vitaminov. Najprej bomo preučevali dejavnike, ki vplivajo na stabilnost posameznih vitaminov, nato možnosti za njihovo stabilizacijo, na koncu pa bomo preverili kombinacije vitaminov in njihove interakcije.

Med dejavniki stabilnosti bomo raziskovali vpliv medija (metanol, destilirana voda, navadna voda, voda MilliQ, 50 % metanola v destilirani vodi), začetne koncentracije posameznih vitaminov, temperature, UV-svetlobe in oksidantov (vodikov peroksid).

Potem bomo poskušali posamezne vitamine stabilizirati z dodatkom dveh znanih antioksidantov (askorbinska kislina in EDTA) v različnih koncentracijah.

V zaključku bomo pripravili raztopine različnih kombinacij vitaminov (A, D₃; A, E; A, K₁; D₃, E; D₃, K₁; E, K₁; A, D₃, E; A, D₃, K₁; A, E, K₁; D₃, E, K₁; A, D₃, E, K₁), da bomo preučili vpliv interakcij med posameznimi vitamini. Ti se namreč v multivitaminskih pripravkih pojavljajo v različnih kombinacijah. Dodaten razlog za vrednotenje kombinacij vitaminov je antioksidativno delovanje vitamina E. V ta namen bomo spreminjali njegovo koncentracijo in opazovali njen vpliv na druge vitamine. Kombinacijam vitaminov bomo dodali tudi stabilizator (EDTA) in preverili, ali se stabilnost vitaminov še poveča.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti, raztopine in referenčne spojine

- L-askorbinska kislina, $C_6H_8O_6$, Sigma-Aldrich, Nemčija, čistost > 99 %
- acetonitril, C_2H_3N , za HPLC, Sigma-Aldrich, Nemčija, čistost $\geq 99,9$ %
- destilirana voda, Fakulteta za farmacijo
- EDTA (Titriplex III), $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_6 \times 2H_2O$, Merck, Nemčija, Ph. Eur.
- filokinon (vitamin K_1), $C_{31}H_{46}O_2$, Sigma-Aldrich, Nemčija, čistost $\geq 99,0$ % (vsota izomerov, HPLC)
- holekalciferol (vitamin D_3), $C_{27}H_{44}O$, Sigma-Aldrich, Nemčija, čistost $\geq 98,0$ % (HPLC)
- klorovodikova kislina, HCl, Titrisol[®] za pripravo 1 M raztopine, Merck, Nemčija
- metanol, CH_3OH , za HPLC, Sigma-Aldrich, Nemčija, čistost $\geq 99,9$ %
- voda MilliQ, Fakulteta za farmacijo
- natrijev hidroksid, NaOH, Titrisol[®] za pripravo 1 M raztopine, Merck, Nemčija
- retinol (vitamin A), $C_{20}H_{30}O$, Sigma-Aldrich, Nemčija, čistost $\geq 97,5$ % (HPLC)
- (\pm)- α -tokoferol (vitamin E), $C_{29}H_{50}O_2$, Fluka analytical, Sigma-Aldrich, Nemčija, Ph. Eur.
- vodovodna voda, Fakulteta za farmacijo
- vodikov peroksid (vsebuje inhibitor), H_2O_2 , 30 wt % v vodi, Sigma-Aldrich, Nemčija

3.1.2 Naprave in pribor

- analitska tehtnica Excellence Plus (Mettler Toledo, Švica)
- hladilnik (Gorenje, Slovenija)
- sistem HPLC 1100-1200 (Agilent Technologies, ZDA): razplinjevalec, kvarтерна črpalka, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, detektor UV-VIS, programska oprema ChemStation
- kolona Gemini C18 $100 \times 4,6$ mm, 3 μ m, (Phenomenex, ZDA)
- kolona Luna C18 $100 \times 4,6$ mm, 5 μ m, (Phenomenex, ZDA)
- kolona Luna C18 $50 \times 4,6$ mm, 3 μ m, (Phenomenex, ZDA)

- kolona Gemini C18 50 × 3 mm, 3 μm, (Phenomenex, ZDA)
- kolona Gemini C18, 100 × 3 mm, 3 μm, (Phenomenex, ZDA)
- predkolona Luna C18 4 × 3,0 mm (Phenomenex, ZDA)
- polavtomatske pipete 20-200 μL, 100-1000 μL (Eppendorf, Nemčija)
- sistem za filtriranje (Sartorius, Nemčija)
- sistem za pripravo vode MilliQ A10 Advantage (Millipore Corporation, ZDA)
- steklovina (čaše, merilne bučke, merilni valji, zamaški, epice, čolnički za tehtanje, vialo)
- ultrazvočna kadička Sonis 4 (Iskra Pio, Slovenija)
- vodna kopel WB 13 (Anton Kambič, Slovenija)

3.2 RAZVOJ ANALIZNE METODE

3.2.1 Priprava vzorcev pri razvoju metode

Priprava referenčnih raztopin:

Najprej smo pripravili raztopine posameznih vitaminov A, D₃, E in K₁. Na tehtnici smo odtehtali vsak vitamin s približno maso 1 mg v svojo epico in vsakemu dodali 1 mL metanola (koncentracija približno 1 mg/mL).

Priprava raztopine mešanice vitaminov:

Pripravili smo raztopino z mešanico vitaminov, tako da smo v vialo napipetirali referenčne raztopine vitaminov, in sicer 50 μL raztopine vitamina A in D₃, 200 μL raztopine vitamina E, 500 μL raztopine vitamina K₁ ter 200 μL metanola v zaporedju padajočih volumnov (različne končne koncentracije – vitamin A in D₃ 50 mg/L, vitamin E 200 mg/L, vitamin K₁ 500 mg/L).

3.2.2 Priprava vzorcev za stresne teste

Priprava raztopin za stresne pogoje:

Najprej smo pripravili 0,1 M raztopino natrijevega hidroksida (NaOH), 0,1 M raztopino klorovodikove kisline (HCl) in 0,3-odstotno raztopino vodikovega peroksida (H₂O₂). V tri različne merilne 100 mL bučke smo napipetirali nekaj destilirane vode, nato pa v prvo 10 mL 1 M NaOH, v drugo 10 mL 1 M HCl in v tretjo 1 mL 30-odstotne raztopine H₂O₂ ter z destilirano vodo vse dopolnili do oznake.

Priprava referenčnih raztopin:

V 5 mL bučko smo pripravili raztopino vitamina A v metanolu s približno koncentracijo 1 mg/mL, tako da smo v bučko odtehtali približno 5 mg vitamina A in z metanolom dopolnili do oznake. Enako smo pripravili referenčne raztopine vitaminov D₃, E in K₁.

Priprava končnih raztopin:

Devetkrat zaporedoma smo z ustreznim topilom v 5 mL bučke redčili referenčne raztopine vitaminov do koncentracije 100 mg/L (preglednica V).

Preglednica V: Priprava končnih raztopin za stresne teste

Bučke	Referenčna raztopina	Topilo	Izpostavitev
Bučka 1	500 µL posameznega vitamina	destilirana voda (DV)	UV-svetloba
Bučka 2			T = 4, 25, 60 °C (poprej razdelili v 3 viale)
Bučka 3		0,1 M HCl	T = 4 °C
Bučka 4			T = 25 °C
Bučka 5			T = 60 °C
Bučka 6		0,1 M NaOH	T = 4 °C
Bučka 7			T = 25 °C
Bučka 8			T = 60 °C
Bučka 9		0,3 % H ₂ O ₂	T = 4, 25, 60 °C (poprej razdelili v 3 viale)

Izpostavljenost stresnim pogojem:

Vzorci smo iz bučk prenesli v vialo (tiste, ki so bili izpostavljeni stresnim pogojem v bučkah) in jih analizirali s HPLC ob časm u 0, nato pa še po 24 in 48 urah izpostavljenosti stresnim pogojem. Vzorci v topilu 0,1 M HCl smo pred meritvijo nevtralizirali z 1 M NaOH, vzorce v topilu 0,1 M NaOH pa z 1 M HCl v razmerju 10 : 1 (0,1 M HCl : 1 M NaOH oz. 0,1 M NaOH : 1 M HCl).

3.2.3 Razvoj in optimiranje analizne metode

V okviru razvoja metode smo z vzorci vitaminov (poglavje 3.2.1) optimirali kromatografske pogoje s spreminjanjem različnih kolon, mobilnih faz in valovnih dolžin, kot je prikazano v preglednici VI.

Preglednica VI: Optimiranje metode s spreminjanjem nekaterih kromatografskih pogojev pri konstantnem pretoku 1 mL/min, volumnu injiciranja 10 µL in temperaturi kolone 40 °C (s krepkim tiskom označen parameter, ki se je spreminjal).

Zaporedna št. metode	Mobilna faza	Stacionarna faza (kolona)	Valovna dolžina
1.	acetonitril	Gemini, 100 × 3 mm, C18	280 nm
2.	acetonitril	Gemini, 100 × 4,6 mm, C18	280 nm
3.	acetonitril	Luna, 100 × 4,6 mm, C18	280 nm
4.	acetonitril	Luna, 50 × 4,6 mm, C18	280 nm
5.	acetonitril	Gemini, 50 × 3 mm, C18	280 nm
6.	metanol	Gemini, 100 × 4,6 mm, C18	280 nm
7.	acetonitril	Gemini, 100 × 4,6 mm, C18	280 nm
8.	98 % metanola : 2 % vode	Gemini, 100 × 4,6 mm, C18	280 nm
9.	99 % metanola : 1 % vode	Gemini, 100 × 4,6 mm, C18	280 nm
10.	50 % metanola : 50 % acetonitrila	Gemini, 100 × 4,6 mm, C18	280 nm
11.	25 % metanola : 75 % acetonitrila	Gemini, 100 × 4,6 mm, C18	280 nm
12.	20 % metanola : 80 % acetonitrila	Gemini, 100 × 4,6 mm, C18	280 nm
13.	30 % metanola : 70 % acetonitrila	Gemini, 100 × 4,6 mm, C18	280 nm
14.	35 % metanola : 65 % acetonitrila	Gemini, 100 × 4,6 mm, C18	280 nm
15.	10 % vode MQ : 67 % acetonitrila : 23 % metanola	Gemini, 100 × 4,6 mm, C18	280 nm
16.	acetonitril	Gemini, 100 × 3 mm, C18	292 nm
17.	acetonitril	Gemini, 100 × 3 mm, C18	290 nm
18.	acetonitril	Gemini, 100 × 3 mm, C18	285 nm
19.	acetonitril	Gemini, 100 × 3 mm, C18	280 nm
20.	acetonitril	Gemini, 100 × 3 mm, C18	265 nm
21.	acetonitril	Gemini, 100 × 3 mm, C18	254 nm
22.	acetonitril	Gemini, 100 x 3 mm, C18	210 nm

3.3 VREDNOTENJE ANALIZNE METODE

3.3.1 Kromatografski pogoji

V preglednici VII so prikazani parametri, ki smo jih izbrali za končne kromatografske pogoje.

Preglednica VII: Končni kromatografski pogoji

HPLC	sistem HPLC 1100-1200 (Agilent Technologies, ZDA)
Mobilna faza	70 % acetonitrila : 30 % metanola za vse vitamine; 10 % vode MQ : 63 % acetonitrila : 27 % metanola za vitamin A pri stabilnostni študiji
Stacionarna faza	kolona Gemini C18, 100 × 4,6 mm, 3 μm
Temperatura kolone	40 °C
Volumen injiciranja	10 μL
Pretok	1 mL/min
Valovna dolžina	280 nm

3.3.2 Priprava vzorcev

Priprava referenčnih raztopin:

Natehtali smo približno natančno 10 mg posameznega vitamina – vsakega v svojo 10 mL bučko in polnili do oznake, tako da je bila koncentracija približno 1 mg/mL.

Priprava raztopin za umeritveno premico:

Pripravili smo kalibracijske in kontrolne raztopine z vsemi štirimi vitamini v koncentracijskem območju od 5 do 250 mg/L (preglednica VIII). Najprej smo v 10 mL bučki pripravili raztopino vseh vitaminov, tako da smo v bučko napipetirali 2,5 mL posamezne referenčne raztopine vitaminov A, D₃, E in K₁ (koncentracija posameznega vitamina je 250 mg/L). Iz nje smo v 10 mL bučko pripravili tudi raztopino s koncentracijo 100 mg/L. Druge raztopine smo pripravili po postopku v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Priprava kalibracijskih in kontrolnih (označeni z modro) vzorcev za umeritveno premico

Koncentracija posameznega vitamina v raztopini (mg/L)	V _{raztopine konc. vit. 250 mg/L} (μL)	V _{MQ} (μL)
200	480	120
150	360	240
100	4000	6000
Koncentracija posameznega vitamina v raztopini (mg/L)	V _{raztopine konc. 100 mg/L} (μL)	V _{MQ} (μL)
75	450	150
50	300	300
25	150	450
10	60	540
7,5	45	555
5	30	570

V preglednici VIII je prikazana priprava raztopin kalibracijskih in kontrolnih (označeni z modro barvo) vzorcev. Kontrolne vzorce smo pripravili na treh koncentracijskih nivojih (nizka, srednja, visoka koncentracija) v treh paralelah, kalibracijske vzorce za umeritveno premico pa v eni paraleli. Vsak dan smo pripravili nove referenčne raztopine vitaminov ter iz njih raztopine vseh v preglednici VIII navedenih koncentracij in jih analizirali.

3.3.3 Vrednotenje metode

Da smo potrdili primernost izbrane analizne metode HPLC za naš namen, smo metodo ovrednotili v skladu s smernicami Mednarodne konference o harmonizaciji (ICH) (58). Preverjali smo selektivnost, linearnost, mejo zaznave in določitve, točnost, ponovljivost ter stabilnost analitov v metanolu.

Selektivnost

Pri selektivnosti metode smo ugotavljali, ali se pri retencijskem času naših analitov koeluirajo druge spojine oz. ali se med njimi pojavljajo morebitne interference. Kromatograme kalibracijskih vzorcev (poglavje 3.3.2) smo primerjali s kromatogrami različnih topil, ki smo jih uporabljali pri stresnih testih in stabilnostni študiji (metanol, 50 % metanola v destilirani vodi, 0,1 M NaOH, 0,1 M HCl, 0,3 % H₂O₂, MQ, navadna, destilirana voda) ter drugih spojin iz stabilnostne študije (askorbinska kislina, EDTA).

Meja zaznave in meja določitve

Mejo zaznave (LOD) metode za posamezne vitamine smo izračunali na podlagi umeritvenih premic po enačbi $LOD = (3,3 \times \sigma)/S$, mejo določitve (LOQ) pa po enačbi $LOQ = (10 \times \sigma)/S$, kjer je σ standardni odklon vrednosti odsekov umeritvene premice na ordinati, S pa povprečna vrednost naklona umeritvene premice (smernice ICH) (58).

Linearnost in območje metode

Linearnost smo vrednotili na podlagi sedmih kalibracijskih vzorcev različnih koncentracij v območju od 5 mg/L do 250 mg/L (poglavje 3.3.2.) tri zaporedne dni. Vsak dan smo pripravili nove osnovne raztopine. Z uporabo metode najmanjših kvadrantov smo na podlagi koncentracij in pripadajočih odzivov izrisali umeritvene premice in izračunali njihov naklon ter odsek na ordinati. Linearnost smo opredelili z vrednostjo R^2 (determinacijski koeficient), za mejo sprejemljivosti pa smo postavili $R^2 \geq 0,999$.

Znotrajdnevna točnost

Znotrajdnevno točnost smo ovrednotili tako, da smo pripravili in analizirali raztopine treh kontrolnih vzorcev na treh koncentracijskih nivojih znotraj enega dneva (poglavje 3.3.2). Na podlagi umeritvenih premic smo izračunali koncentracijo vitaminov v vzorcih. Točnost smo predstavili kot razmerje (%) med izračunano in dejansko koncentracijo vitaminov v vzorcih. Za mejo sprejemljivosti smo postavili interval $100 \pm 10 \%$.

Meddnevna točnost

Meddnevno točnost smo ovrednotili tako, da smo z umeritveno premico prvega dne izračunali koncentracije vitaminov v kontrolnih vzorcih drugega in tretjega dne (poglavje 3.3.2). Točnost smo tudi v tem primeru podali kot razmerje (%) med izračunano in dejansko koncentracijo vitaminov v vzorcih. Za mejo meddnevne točnosti smo postavili interval odstopanja $100 \pm 10 \%$.

Znotrajdnevna ponovljivost

Znotrajdnevno ponovljivost smo ovrednotili tako, da smo primerjali ujemanje rezultatov treh paralel kontrolnih vzorcev v enem dnevu (isti vzorci kot za vrednotenje točnosti, poglavje 3.3.2). Podali smo jo kot relativni standardni odklon (RSD) meritev treh paralel kontrolnih vzorcev na treh koncentracijskih nivojih. Za mejo sprejemljivosti smo določili odstopanje do 5 %.

Meddnevna ponovljivost

Za vrednotenje meddnevne ponovljivosti smo primerjali stopnjo ujemanja rezultatov meritev med kontrolnimi vzorci (poglavje 3.3.2) prvega, drugega in tretjega dne. Izračunali smo RSD meritev treh paralel kontrolnih vzorcev znotraj treh dni. Za mejo sprejemljivosti smo določili odstopanje do 5 %.

Ponovljivost injiciranja

Tri kontrolne vzorce (z vsakega nivoja enega) smo zaporedoma injicirali in izračunali RSD šestih ponovitev. Za mejo sprejemljivosti smo postavili odstopanje za največ 2 %.

Stabilnost

Stabilnost vitaminov smo ovrednotili tako, da smo tri zaporedne dni injicirali iste kontrolne vzorce na treh nivojih (poglavje 3.3.2), shranjene pri 25 °C, in izračunali delež posameznih vitaminov po 24 in 48 urah glede na začetno koncentracijo, izraženo v odstotkih.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

STABILNOSTNE ŠTUDIJE

Vzorci za preučevanje stabilnosti smo pripravili in shranjevali pri temperaturi 25 °C v avtomatskem vzorčevalniku sistema HPLC, razen pri študiji vpliva temperature, kjer smo jih izpostavili višji in nižji temperaturi. Vzorci smo shranjevali v transparentnih vialah (razen v primeru študije vpliva svetlobe) in smo jih v različnih časovnih intervalih neposredno analizirali z metodo HPLC.

Priprava referenčnih raztopin (ref. razt.):

a) Ref. razt. 2 mg/mL: Pripravili smo referenčno raztopino posameznega vitamina, tako da smo odtehtali približno 10 mg posameznega vitamina v 5 mL bučko in jo z metanolom dopolnili do oznake (približna koncentracija 2 mg/mL).

b) Ref. razt. 5 mg/mL: Pripravili smo raztopine posameznih vitaminov, tako da smo odtehtali približno 5 mg posameznega vitamina – vsakega v svojo mikrocentrifugirko – in dodali 1 mL metanola (približna koncentracija 5 mg/mL).

4.1 POSAMEZNI VITAMINI

4.1.1 Topila

Uporaba referenčnih raztopin: *a)* Ref. razt. 2 mg/mL (začetek 4. poglavja)

Priprava končnih raztopin vzorcev:

Referenčne raztopine vitaminov smo redčili z vodo MilliQ, destilirano in navadno vodo (MQ, DV, NV), metanolom in 50 % metanola v DV, tako da smo odpipetirali 50 µL referenčne raztopine vsakega vitamina v 950 µL topila v viali (približna koncentracija vitamina 100 mg/L).

Potek dela:

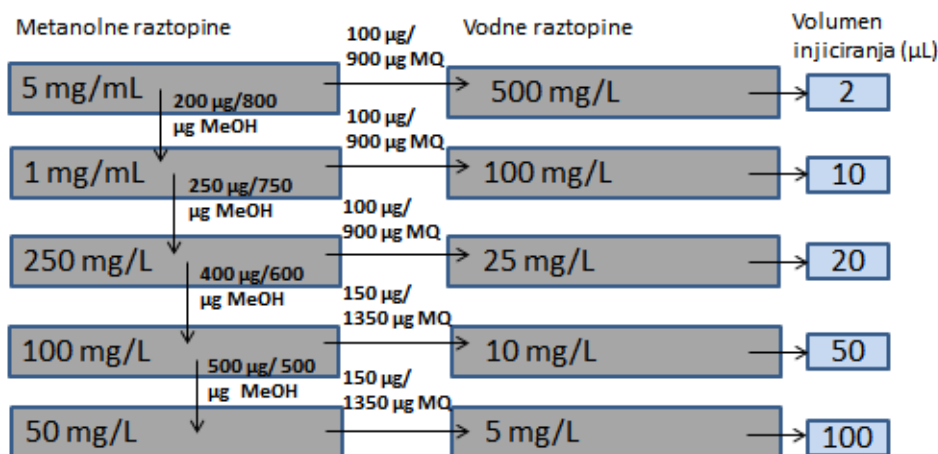
Vsak vzorec smo naredili v treh paralelah in ga analizirali ob času 0, po 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 urah ter 7. in 14. dan. Stabilne vitamine v vzorcih smo spremljali tudi v poznejših časovnih točkah. Vzorci z vitaminom A in vitaminom D₃ smo shranjevali 14 dni, z vitaminom E 18 dni in z vitaminom K₁ 31 dni.

4.1.2 Različne začetne koncentracije

Priprava referenčnih raztopin: *b)* Ref. razt. 5 mg/mL (začetek 4. poglavja)

Priprava končnih raztopin vzorcev (v vodi MQ):

Iz referenčnih raztopin smo pripravili preostale raztopine, kot prikazuje slika 5. Tako smo zagotovili, da je bil v vseh vzorcih enak delež metanola v vodi (10 %). Analizirali smo le vodne vzorce.



Slika 5: Priprava metanolnih in vodnih raztopin vitaminov

Potek dela:

Vzorci smo pripravili v treh paralelah. Volumen injiciranja smo spreminjali glede na koncentracijo končne raztopine vzorcev (slika 5). Vzorci posameznega vitamina smo analizirali pri času 0, po 6, 12, 18, 24 urah. Vzorci stabilnih vitaminov smo analizirali tudi v kasnejših časovnih točkah. Vitamin A smo shranjevali do 6 ur, vitamin D₃ 48 ur, vitamin E 14 dni in vitamin K₁ 29 dni.

4.1.3 Temperatura in UV-svetloba

Priprava referenčnih raztopin: b) Ref. razt. 5 mg/mL (začetek 4. poglavja)

Priprava končnih raztopin:

Pripravili smo raztopine posameznih vitaminov, tako da smo v vialo napipetirali 980 µL vode MQ in 20 µL vitamina (koncentracija približno 100 mg/L).

Potek dela:

Vse vzorce smo pripravili v treh paralelah in jih shranjevali pri temperaturi 4 in 40 °C (v hladilniku in v avtomatskem vzorčevalniku sistema HPLC s temperaturo 40 °C) ter izpostavili UV-svetlobi pri sobni temperaturi v prozornih in temnih vialah. Vzorci z vitaminom A smo pri 4 °C shranjevali 15 ur, pri 40 °C 2 uri in na UV-svetlobi 1 uro, vzorce z vitamini D₃, E in K₁ pa pri 4 °C 48 ur, pri 40 °C 18 ur in na UV-svetlobi 9 ur. Priprava vzorcev pri 25 °C v vodi MQ je opisana v poglavju 4.1.1.

4.1.4 Oksidanti – vodikov peroksid

Priprava referenčnih raztopin vitaminov: b) Ref. razt. 5 mg/mL (začetek 4. poglavja)

Priprava raztopin vodikovega peroksida:

3 % H₂O₂: V 10 mL bučko smo prenesli nekaj mL vode MQ, vanjo napipetirali 1 mL 30 % H₂O₂ in nato bučko z vodo MQ dopolnili do oznake.

0,3 % H₂O₂: V 10 mL bučko smo prenesli nekaj mL vode MQ, vanjo napipetirali 1 mL 3 % H₂O₂ in bučko z vodo MQ dopolnili do oznake.

Priprava končnih raztopin:

Pripravili smo raztopine posameznih vitaminov (po en vitamin na dan) s koncentracijo 100 mg/L v vodikovem peroksidu različnih koncentracij, kot je prikazano v preglednici IX.

Preglednica IX: Priprava končnih raztopin vitaminov z vodikovim peroksidom

Raztopina H ₂ O ₂	V _{ref. razt. vit.} (μL)	30 % H ₂ O ₂ (μL)	3 % H ₂ O ₂ (μL)	0,3 % H ₂ O ₂ (μL)	MQ (μL)
6 %	30	300	/	/	1170
3 %	30	150	/	/	1320
0,3 %	30	/	150	/	1320
0,03 %	30	/	/	150	1320
0 %	30	/	/	/	1470

Potek dela:

Vse vzorce smo pripravili v treh paralelah. Stabilnost vitamina A smo spremljali 3 ure (meritve v časovnih točkah: 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 h), vitamina E 76 ur (meritve v časovnih točkah: 0; 1,5; 3,5; 5; 6,5; 8,5; 10; 17; 24; 76 h), vitamina D₃ in K₁ pa 6 dni (meritve v časovnih točkah: 0; 1,5; 3; 4,5; 6; 14; 21; 24; 45; 69 h; 6. dan).

4.1.5 Dodatek askorbinske kislinske

Priprava referenčnih raztopin:

Vitamini: b) Ref. razt. 5 mg/mL (začetek 4. poglavja)

Askorbinska kislina (AK): Najprej smo pripravili raztopino AK s koncentracijo 2 mg/mL, in sicer tako, da smo v 10 mL bučko odtehtali približno 20 mg AK in bučko z vodo MQ dopolnili do oznake. Nato smo pripravili raztopino s koncentracijo 100 mg/L, in sicer tako, da smo v 5 mL bučko napipetirali 250 μL AK koncentracije 2 mg/mL in z vodo MQ dopolnili do oznake.

Priprava končnih raztopin:

Pripravili smo raztopine posameznih vitaminov z dodatkom AK, kjer je bila koncentracija vitaminov 100 mg/L, koncentracije AK pa so bile različne (preglednica X).

Preglednica X: Priprava končnih raztopin vitaminov z dodatkom različnih koncentracij AK

Konc. AK (mg/L)	V_{ref. razt. vit.} (μL)	V_{AK 100 mg/L} (μL)	V_{AK 2 mg/mL} (μL)	V_{MQ} (μL)
0	30	/	/	1470
10	30	150	/	1320
100	30	/	75	1395
500	30	/	375	1095
1000	30	/	750	720

Potek dela:

Vse vzorce smo pripravili v treh paralelah. Vzorce z vitaminom A smo shranjevali 3 ure in jih analizirali v časovnih točkah 0, 1,5 in 3 h, z vitamini D₃, E in K₁ pa 5 dni in jih analizirali v časovnih točkah 0, 9, 18, 28 h in 5. dan.

4.1.6 Dodatek EDTA

Priprava referenčnih raztopin:

Vitaminski: b) Ref. razt. 5 mg/mL (začetek 4. poglavja)

EDTA: Najprej smo pripravili raztopino EDTA s koncentracijo 1 mg/mL, in sicer tako, da smo v 10 mL bučko odtehtali 12,73 mg dinatrijevega EDTA dihidrata in z vodo MQ dopolnili do oznake. Nato smo pripravili raztopino s koncentracijo 100 mg/L. V 10 mL bučko smo napipetirali 1 mL raztopine EDTA s koncentracijo 1 mg/mL in z vodo MQ dopolnili do oznake.

Priprava končnih raztopin:

Pripravili smo raztopine vitaminov in EDTA, kjer je bila koncentracija vitaminov 100 mg/L, koncentracije EDTA pa so bile različne (0-500 mg/L). Vzorce smo pripravili, kot je prikazano v preglednici XI.

Preglednica XI: Priprava končnih raztopin vitaminov z dodatkom različnih konc. EDTA

Konc.-EDTA (mg/L)	V_{ref. razt. vit.} (μL)	V_{EDTA 100 mg/L} (μL)	V_{EDTA 1 mg/mL} (μL)	V_{MQ} (μL)
0	20	/	/	980
5	20	50	/	930
25	20	250	/	730
100	20	/	100	880
500	20	/	500	480

Potek dela:

Vzorci smo pripravili v treh paralelah. Raztopine z vitaminom A smo spremljali 9 ur in jih analizirali na vsake 1,5 ure, raztopine z vitamini D₃, E in K₁ pa 19 dni in jih analizirali v časovnih točkah 0, 9, 18, 36, 48, 60, 85 h in 19. dan.

4.1.7 Dodatek EDTA in askorbinske kisline

Priprava referenčnih raztopin:

Vitaminski: b) Ref. razt. 5 mg/mL (začetek 4. poglavja)

EDTA: V 5 mL bučko smo odtehtali 3,185 mg dinatrijevega EDTA dihidrata in jo z vodo MQ dopolnili do oznake (koncentracija raztopine 500 mg/L).

AK: Enako kot v poglavju 4.1.5.

Priprava končnih raztopin:

Pripravili smo raztopine posameznih vitaminov z dodatkom EDTA in AK, kjer je bila koncentracija vitaminov 100 mg/L, koncentracija EDTA 25 mg/L, koncentracije AK pa so bile različne (0-1000 mg/L). Vzorci smo pripravili tako, kot je prikazano v preglednici XII.

Preglednica XII: Priprava končnih raztopin vitaminov z dodatkom EDTA in AK

Konc. AK (mg/L)	V_{ref. razt. vit.} (μL)	V_{AK 100 mg/L} (μL)	V_{AK 2 mg/mL} (μL)	V_{EDTA 500 mg/L} (μL)	V_{MQ} (μL)
0	30	/	/	75	1395
10	30	150	/	75	1245
100	30	/	75	75	1320
500	30	/	375	75	1020
1000	30	/	750	75	645

Potek dela:

Vzorci smo pripravili v treh paralelah. Raztopine z vitaminom A smo shranjevali 9 ur in jih analizirali vsake 1,5 ure, raztopine z vitamini D₃, E in K₁ pa 4 dni in jih analizirali v časovnih točkah 0, 9, 18, 36 h in 4. dan.

4.2 KOMBINACIJE VITAMINOV

4.2.1 Topila

Priprava referenčnih raztopin: b) Ref. razt. 5 mg/mL (začetek 4. poglavja)

Priprava končnih raztopin:

Pripravili smo raztopine različnih kombinacij vitaminov v vodi MQ, navadni vodi in metanolu (preglednici XIII in XIV), kjer je bila koncentracija vsakega vitamina 100 mg/L. V vse raztopine z vodo MQ in navadno vodo smo dodali še toliko metanola, da je bila njegova vsebnost v vseh vzorcih 8-odstotna (preglednica XIII).

Preglednica XIII: Priprava končnih raztopin kombinacij vitaminov v MQ in navadni vodi

Kombinacije vitaminov	V_{ref. razt. vit. A} (μL)	V_{ref. razt. vit. D₃} (μL)	V_{ref. razt. vit. E} (μL)	V_{ref. razt. vit. K₁} (μL)	V_{MeOH} (μL)	V_{MQ oz. V_{NV}} (μL)
A, D ₃	30	30	/	/	60	1380
A, E	30	/	30	/	60	1380
A, K ₁	30	/	/	30	60	1380
D ₃ , E	/	30	30	/	60	1380
D ₃ , K ₁	/	30	/	30	60	1380
E, K ₁	/	/	30	30	60	1380
A, D ₃ , E	30	30	30	/	30	1380
A, D ₃ , K ₁	30	30	/	30	30	1380
A, E, K ₁	30	/	30	30	30	1380
D ₃ , E, K ₁	/	30	30	30	30	1380
A, D ₃ , E, K ₁	30	30	30	30	/	1380

Preglednica XIV: Priprava končnih raztopin kombinacij vitaminov v metanolu

Kombinacije vitaminov	V_{ref. razt. vit. A} (μL)	V_{ref. razt. vit. D₃} (μL)	V_{ref. razt. vit. E} (μL)	V_{ref. razt. vit. K₁} (μL)	V_{MeOH} (μL)
A, D ₃	30	30	/	/	1440
A, E	30	/	30	/	1440
A, K ₁	30	/	/	30	1440
D ₃ , E	/	30	30	/	1440
D ₃ , K ₁	/	30	/	30	1440
E, K ₁	/	/	30	30	1440
A, D ₃ , E	30	30	30	/	1410
A, D ₃ , K ₁	30	30	/	30	1410
A, E, K ₁	30	/	30	30	1410
D ₃ , E, K ₁	/	30	30	30	1410
A, D ₃ , E, K ₁	30	30	30	30	1380

Potek dela:

Vsak vzorec smo pripravili v treh paralelah. Vzorce vitamina A v vodi MQ smo shranjevali 89 ur, vitaminov D₃, E in K₁ pa 10 dni in jih analizirali v časovnih točkah 0, 6, 12, 24, 36, 48, 89 h in 10. dan. V navadni vodi smo vzorce vitamina A shranjevali 4 dni, vzorce vitaminov D₃, E in K₁ pa 10 dni in jih analizirali v časovnih točkah 0, 6, 12, 24, 34,

4. in 10. dan. V metanolu smo vzorce vseh vitaminov shranjevali 8 dni in jih analizirali v časovnih točkah 0, 6, 12, 24, 48 h in 8. dan.

4.2.2 Različne koncentracije vitamina E

Priprava referenčnih raztopin: b) Ref. razt. 5 mg/mL (začetek 4. poglavja)

Priprava končnih raztopin vzorcev:

Pripravili smo raztopine različnih kombinacij vitaminov, kjer smo spreminjali koncentracijo vitamina E (20, 200 in 500 mg/L), koncentracija drugih vitaminov pa je bila konstantna 100 mg/L. Postopek priprave vzorcev je opisan v preglednici XV.

Preglednica XV: Priprava končnih raztopin vitaminov ob treh različnih konc. vitamina E

Kombinacije vitaminov	V _{ref. razt. vit. A} (μL)	V _{ref. razt. vit. D3} (μL)	V _{ref. razt. vit. E} (μL)	V _{ref. razt. vit. K1} (μL)	V _{MeOH} (μL)	V _{MQ} (μL)	Celoten V (μL)
E 20	/	/	20	/	780	4200	5000
E 200	/	/	40	/	120	840	1000
E 500	/	/	100	/	60	840	1000
A, E 20	100	/	20	/	680	4200	5000
A, E 200	20	/	40	/	100	840	1000
A, E 500	20	/	100	/	40	840	1000
K ₁ , E 20	/	/	20	100	680	4200	5000
K ₁ , E 200	/	/	40	20	100	840	1000
K ₁ , E 500	/	/	100	20	40	840	1000
D ₃ , E 20	/	100	20	/	680	4200	5000
D ₃ , E 200	/	20	40	/	100	840	1000
D ₃ , E 500	/	20	100	/	40	840	1000
A, D ₃ , E 20	100	100	20	/	580	4200	5000
A, D ₃ , E 200	20	20	40	/	80	840	1000
A, D ₃ , E 500	20	20	100	/	20	840	1000
A, K ₁ , E 20	100	/	20	100	580	4200	5000
A, K ₁ , E 200	20	/	40	20	80	840	1000
A, K ₁ , E 500	20	/	100	20	20	840	1000
D ₃ , K ₁ , E 20	/	100	20	100	580	4200	5000
D ₃ , K ₁ , E 200	/	20	40	20	80	840	1000
D ₃ , K ₁ , E 500	/	20	100	20	20	840	1000
A, D ₃ , K ₁ , E 20	100	100	20	100	480	4200	5000
A, D ₃ , K ₁ , E 200	20	20	40	20	60	840	1000
A, D ₃ , K ₁ , E 500	20	20	100	20	/	840	1000

Potek dela:

Vzorce smo pripravili v treh paralelah neposredno v vialah, razen pri raztopinah s koncentracijo vitamina E 20 mg/L, kjer smo raztopine najprej pripravili v 5 mL bučke,

nato pa jih odpipetirali v viale. Pri kombinacijah vitaminov A, E; D₃, E; K₁, E in pri samem vitaminu E smo vzorce shranjevali 85 ur in jih analizirali ob času 0, 6, 12, 24, 36, 85 h, pri kombinacijah A, D₃, E; A, K₁, E; D₃, K₁, E in A, D₃, K₁, E pa smo vzorce vitaminov analizirali v časovnih točkah 0, 6, 12, 24, 32, 56 h.

4.2.3 Različne koncentracije vitamina K₁

Priprava referenčnih raztopin: b) Ref. razt. 5 mg/mL (začetek 4. poglavja)

Priprava končnih raztopin vzorcev:

Pripravili smo raztopine različnih kombinacij vitaminov (preglednica XVI), kjer smo v vzorcih spreminjali koncentracijo vitamina K₁ (20, 200 in 500 mg/L), koncentracija drugih vitaminov pa je bila vseskozi 100 mg/L.

Preglednica XVI: Priprava končnih raztopin vitaminov ob treh različnih konc. vitamina K₁

Kombinacije vitaminov	V _{ref. razt. vit. D₃} (μL)	V _{ref. razt. vit. E} (μL)	V _{ref. razt. vit. K₁} (μL)	V _{MeOH} (μL)	V _{MQ} (μL)	Celoten V (μL)
D ₃ , E, K ₁ 20	100	100	20	480	4300	5000
D ₃ , E, K ₁ 200	30	30	60	90	1290	1500
D ₃ , E, K ₁ 500	30	30	150	/	1290	1500
D ₃ , K ₁ 20	100	/	20	580	4300	5000
D ₃ , K ₁ 200	30	/	60	120	1290	1500
D ₃ , K ₁ 500	30	/	150	30	1290	1500
E, K ₁ 20	/	100	20	580	4300	5000
E, K ₁ 200	/	30	60	120	1290	1500
E, K ₁ 500	/	30	150	30	1290	1500
K ₁ 20	/	/	20	680	4300	5000
K ₁ 200	/	/	60	150	1290	1500
K ₁ 500	/	/	150	60	1290	1500
D ₃ 100	30	/	/	180	1290	1500
E 100	/	30	/	180	1290	1500

Potek dela:

Vsak vzorec smo pripravili v treh paralelah neposredno v vialah, razen pri raztopinah s koncentracijo vitamina K₁ 20 mg/L, kjer smo raztopine najprej pripravili v bučkah in jih nato odpipetirali v viale. Vzorce vitaminov smo shranjevali 12 dni in jih analizirali v časovnih točkah pri 0, 6, 12, 24, 48, 72 urah ter 5., 6. in 12. dan.

4.2.4 Dodatek EDTA

Priprava referenčnih raztopin:

Vitaminski: b) Ref. razt. 5 mg/mL (začetek 4. poglavja)

EDTA: Enako kot v poglavju 4.1.7.

Priprava končnih raztopin:

Pripravili smo raztopine vseh kombinacij vitaminov z dodatkom EDTA, kjer je bila koncentracija posameznega vitamina 100 mg/L, koncentracija EDTA pa 25 mg/L. Raztopine vzorcev smo pripravili tako, kot je prikazano v preglednici XVII.

Preglednica XVII: Priprava končnih raztopin kombinacij vitaminov z dodatkom EDTA

Kombinacije vitaminov	V_{ref. razt.} vit. A (μL)	V_{ref. razt. vit.} D3 (μL)	V_{ref. razt.} vit. E (μL)	V_{ref. razt.} vit. K1 (μL)	V_{MeOH} (μL)	V_{EDTA 500} mg/L (μL)	V_{MQ} (μL)
A, D ₃	30	30	/	/	60	75	1305
A, E	30	/	30	/	60	75	1305
A, K ₁	30	/	/	30	60	75	1305
D ₃ , E	/	30	30	/	60	75	1305
D ₃ , K ₁	/	30	/	30	60	75	1305
E, K ₁	/	/	30	30	60	75	1305
A, D ₃ , E	30	30	30	/	30	75	1305
A, D ₃ , K ₁	30	30	/	30	30	75	1305
A, E, K ₁	30	/	30	30	30	75	1305
D ₃ , E, K ₁	/	30	30	30	30	75	1305
A, D ₃ , E, K ₁	30	30	30	30	/	75	1305

Potek dela:

Vzorce vseh kombinacij vitaminov smo pripravili v treh paralelah in shranjevali 16 dni ter jih analizirali v časovnih točkah po 0, 6, 12, 24, 36, 43, 76 urah in po 16 dneh.

4.3. STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Rezultate smo pridobili z metodo HPLC. Obdelali smo jih s pomočjo programske opreme Microsoft Excel 2010. Vse rezultate in točke na grafih smo podali kot povprečno vrednost. Pri vrednotenju metode smo rezultate tudi statistično ovrednotili, tako da smo izračunali povprečno vrednost vitaminov A, D₃, E in K₁ v paralelah vzorcev, RSD in R². Upad koncentracije vitaminov sledi kinetiki prvega reda, tako smo konstanto reakcijske hitrosti prvega reda izračunali po enačbi $k_1 = 1/t \times \ln(c_0/c)$, kjer t pomeni čas, c₀ začetno koncentracijo in c koncentracijo ob času t.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

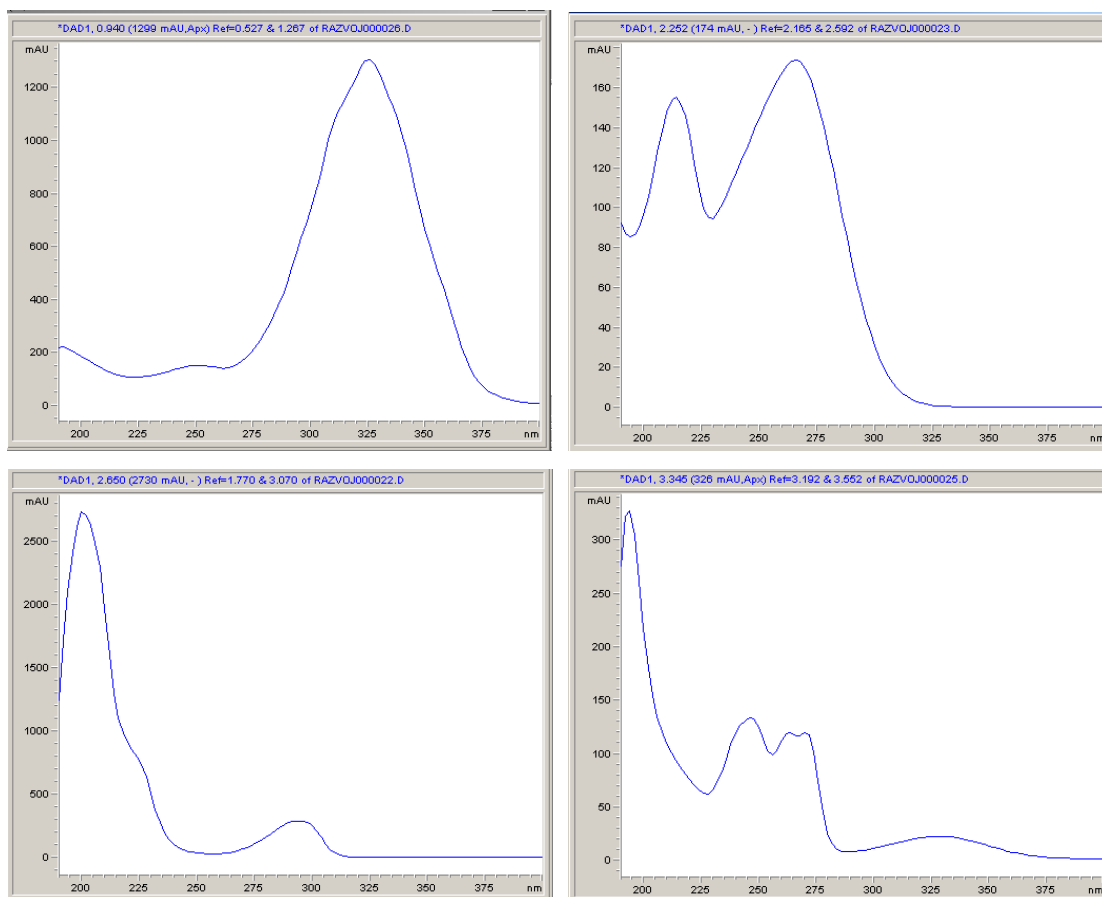
5.1 RAZVOJ ANALIZNE METODE

Lipofilni vitamini so v splošnem precej nestabilni. Občutljivi so na kisik, svetlobo in segrevanje (28). Pojavljajo se v velikem številu prehranskih dopolnil, zato je analitika, s katero lahko vrednotimo njihovo vsebnost in stabilnost, zelo pomembna. Ker so v pripravkih velikokrat skupaj z drugimi vitamini (multivitaminski pripravki), je dostopnost metod za vrednotenje več lipofilnih vitaminov hkrati, zelo koristna. Za naše raziskovalno delo smo potrebovali metodo, s katero bi lahko vrednotili stabilnost štirih lipofilnih vitaminov A, D₃, E in K₁. V objavljenih člankih so metode za vrednotenje lipofilnih vitaminov sicer dostopne, vendar redko za vse štiri vitamine hkrati. Ker primerne metode za naše potrebe nismo našli, saj smo želeli preprosto in hitro metodo za sočasno vrednotenje vsebnosti vseh štirih vitaminov, smo se odločili, da razvijemo novo analizno metodo in jo nato ovrednotimo.

Na podlagi objavljenih metod (poglavje 1.7, preglednica IV) smo se odločili za prvotne pogoje pri postavitvi nove metode. Naš cilj je bil kromatografsko ločiti vitamine in dobiti kromatografske vrhove s primerno obliko in širino vrhov ob čim krajšem času analize.

Pripravili smo mešanico vitaminov A, D₃, E in K₁ v metanolu (poglavje 3.2.1) in ta vzorec uporabili pri razvoju metode. Za izhodiščno mobilno fazo smo uporabili 100-odstotni acetonitril s pretokom 1 mL/min, saj so izbrani vitamini nepolarni in zato potrebujejo velik delež organskega modifikatorja za spiranje iz reverznofazne kolone. Za acetonitril smo se odločili na podlagi znanstvenih člankov (poglavje 1.7, preglednica IV) in izdelane magistrske naloge z vitaminom D₃ (60). Najprej smo izbirali stacionarno fazo. Preverjali smo različne kolone C18 (poglavje 3.2.3, preglednica VI, metode 1.-5.), saj se na kolonah C18 nepolarni analiti zadržujejo in dobro ločijo. Na podlagi narejenih analiz smo izbrali kolono **Gemini C18, 100 × 4.6 mm, 3 μm**, saj je izkazovala najboljšo ločiljivost med vitamini ter ozke in simetrične oblike kromatografskih vrhov. Da bi ločili analite v čim krajšem času, smo v nadaljevanju optimirali tudi mobilno fazo, in sicer od 100-odstotnega acetonitrila in 100-odstotnega metanola do različnih razmerij teh dveh topil z različnimi dodatki vode MQ (poglavje 3.2.3, preglednica VI, metode 6.-15.). Opazili smo, da so bili retencijski časi vitaminov veliko krajši pri uporabi metanola kot pa acetonitrila. Delež vode v mobilni fazi pa je izboljšal ločiljivost kromatografskih vrhov, a bistveno podaljšal čas

analize. Zaradi najboljše ločljivosti in oblike ter širine kromatografskih vrhov vitaminov, vendar še vedno dokaj kratkih retencijskih časov, smo se odločili za mobilno fazo, v kateri je **70 % acetonitrila in 30 % metanola**. V nadaljevanju smo določili še optimalno valovno dolžino za detekcijo vitaminov. Najprej smo posneli absorpcijske spektre vitaminov in ugotovili, da ima vitamin A maksimum pri 325 nm, vitamin D₃ pri 210 in 270 nm, vitamin E pri 210, 230 in 292 nm ter vitamin K₁ pri 200, 248, 265 in 275 nm (slika 6). Nato smo posneli kromatograme vseh štirih vitaminov pri valovnih dolžinah 292, 290, 285, 280, 265, 254 in 210 nm. Izbrali smo valovno dolžino **280 nm**, saj je predstavljala optimalen kompromis med odzivi različnih vitaminov. Pretok je bil vseskozi **1 mL/min**, temperatura kolone pa **40 °C**. Pri končnih kromatografskih pogojih je bil retencijski čas vitamina A 2,00 min, vitamina D₃ 4,45 min, vitamina E 5,15 min in vitamina K₁ 6,80 min (slika 8).



Slika 6: Absorpcijski spektri vitaminov; vitamin A zgoraj levo, vitamin D₃ zgoraj desno, vitamin E spodaj levo, vitamin K₁ spodaj desno

Metodo smo preverili tudi s stresnimi vzorci, ki smo jih pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.2.2. S temi vzorci smo želeli ugotoviti stabilnostno indikativni značaj metode – ali se vitamini ločijo od morebitnih razpadnih produktov. Ugotovili smo, da se vitamini E, D₃ in K₁ v vseh vzorcih ustrezno ločijo od njihovih razpadnih produktov. Le pri vitaminu A se pri nekaterih stresnih pogojih pojavijo razpadni produkti, ki deloma motijo analizo vitamina A. V preglednici XVIII so prikazani podatki o stabilnosti stresnih vzorcev, ki smo jih dobili po 24 oz. 48 urah izpostavljenosti vitaminov določenim stresnim pogojem.

Preglednica XVIII: Rezultati stresnih testov po 24 in 48 urah v % glede na začetno konc.

Vitamini in čas	Vit. A 24 h	Vit. A 48 h	Vit. D₃ 24 h	Vit. D₃ 48 h	Vit. E 24 h	Vit. E 48 h	Vit. K₁ 24 h	Vit. K₁ 48 h
Izpostavljenost								
UV	0	0	0,2	0	7,4	0	17,6	6,6
DV 4 °C	0,5	0	65,3	10,2	71,9	0	99,5	98,3
DV 25 °C	0	0	0,7	0	9,8	0	98,3	95,6
DV 60 °C	0	0	0,6	0	0	0	100,7	99,8
HCl 4 °C	21,9	0	11,1	0	75,1	43,2	84,5	49,2
HCl 25 °C	0	0	0	0	41,2	16,1	72,7	38,9
HCl 60 °C	0	0	0	0	11,8	0	36,1	7,1
NaOH 4 °C	26,4	0	28,1	20,8	0	0	88,1	78,3
NaOH 25 °C	15,6	0	34,5	28,3	0	0	39,8	24,7
NaOH 60 °C	0	0	14,2	9,1	0	0	18,3	8,1
H₂O₂ 4 °C	2,0	0	67,0	3,6	81,5	48,9	99,6	98,2
H₂O₂ 25 °C	0	0	7,1	1,9	46,6	29,4	99,4	98,0
H₂O₂ 60 °C	0	0	5,8	2,4	0	0	81,6	40,8

V stresnih vzorcih razpadni produkti nastanejo, ampak ne motijo naših analitov. Do nekoliko slabše ločitve pride le pri vitaminu A pri izpostavljenosti zelo stresnim pogojem dlje časa. Zato smo se odločili, da v okviru stabilnostne študije za vitamin A metodo nekoliko prilagodimo, in sicer tako, da mobilni fazi dodamo 10 % vode MQ, razmerje metanola in acetonitrila pa ostane enako. Retencijski čas vitamina A je pri tej metodi 3,50 min in se na bazni črti loči od vseh njegovih razpadnih produktov.

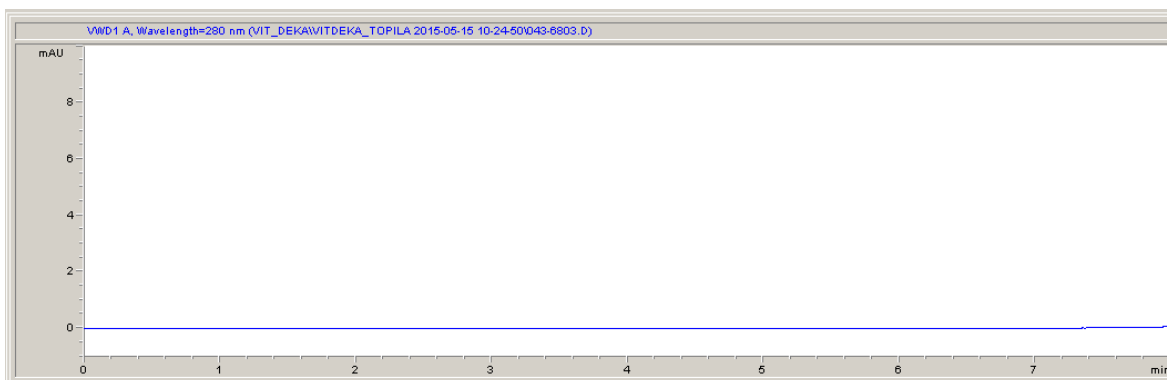
5.2 VREDNOTENJE ANALIZNE METODE

Da bi potrdili ustreznost izbrane analizne metode (poglavje 5.1) za vrednotenje lipofilnih vitaminov, smo metodo ovrednotili s tridnevno validacijo v skladu s smernicami ICH,

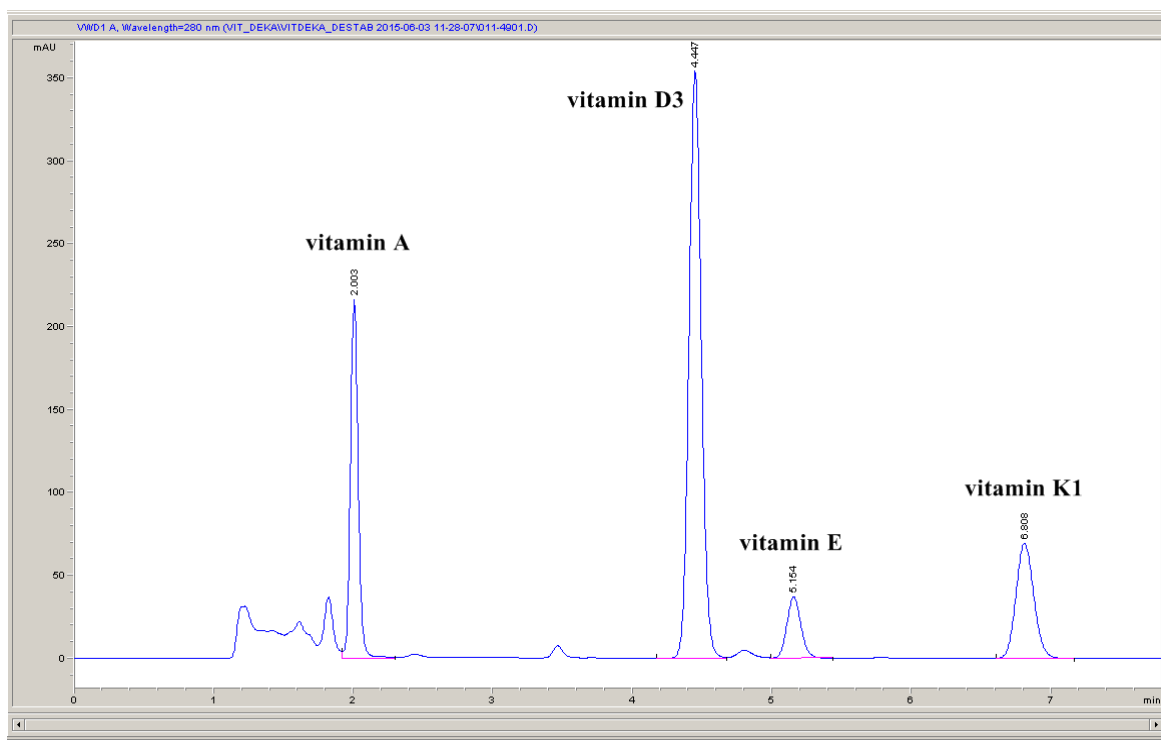
namenjenimi validaciji analiznih metod (58). Vrednotili smo selektivnost, linearnost in območje metode, mejo zaznave in določitve, znotrajdnevno in meddnevno točnost in ponovljivost, ponovljivost injiciranja in stabilnost analitov.

5.2.1 Selektivnost

Selektivnost smo vrednotili kot je opisano v poglavju 3.3.3. Kromatografski vrhovi vitaminov pri različnih stresnih vzorcih in pri vzorcih stabilnostne študije, ki smo jih pripravili z različnimi topili in pri katerih smo dodajali različne spojine, navedene v poglavju 3.3.3, se niso prekrivali z vrhovi drugih topil oz. drugih prisotnih spojin. Tudi vrhovi razpadnih produktov posameznih vitaminov so se dobro ločili od vrhov vitaminov. Nekoliko slabša ločitev je bila pri vitaminu A pri izpostavljenosti zelo stresnim pogojem dlje časa, zato smo metodo zanj nekoliko prilagodili (poglavje 5.1). Sliki 7 in 8 prikazujeta kromatograma topila (metanol) in analiziranih vitaminov pri koncentraciji 100 mg/L. Selektivnost naše metode smo tako potrdili.



Slika 7: Kromatogram topila (metanola)



Slika 8: Kromatogram analiziranih vitaminov pri koncentraciji 100 mg/L

5.2.2 Linearnost in območje metode

Določanje linearnosti in območja metode je opisano v poglavju 3.3.3. V preglednici XIX so prikazane enačbe umeritvenih premic (UM) vitaminov. R^2 , s katerim smo preverjali linearnost, je za vse vitamine pri vseh UM višji od 0,999, kar je znotraj meje sprejemljivosti za linearnost. Glede na to lahko potrdimo, da je metoda v koncentracijskem območju od 5 do 250 mg/L linearna za vse vitamine.

Preglednica XIX: Umeritvene premice za vitamine v treh zaporednih dneh

	Vitamin A	Vitamin D ₃	Vitamin E	Vitamin K ₁
Naklon UM 1	8,3299	21,7033	2,6196	6,1426
Naklon UM 2	7,8896	22,0738	2,6694	6,0447
Naklon UM 3	7,4642	22,2230	2,7507	6,1025
Odsek na ordinati UM 1	28,5957	84,8420	10,5203	23,4914
Odsek na ordinati UM 2	30,4910	86,2381	9,9762	26,8953
Odsek na ordinati UM 3	22,8691	65,0658	7,2572	21,4217
R² UM 1	0,9994	0,9996	0,9992	0,9993
R² UM 2	0,9996	0,9997	0,9997	0,9995
R² UM 3	0,9998	0,9998	0,9998	0,9995

5.2.3 Meja zaznave in meja določitve

Mejo zaznave (LOD) in določitve (LOQ) vitaminov smo določali po postopku, opisanem v poglavju 3.3.3. LOD je bila pri vseh vitaminih manjša od 1,5 mg/L, LOQ pa manjša od 4 mg/L (preglednica XX).

Preglednica XX: Meja zaznave in določitve posameznega vitamina

	Vit. A	Vit. D ₃	Vit. E	Vit. K ₁
LOD (mg/L)	0,55	0,75	0,48	1,30
LOQ (mg/L)	1,65	2,29	1,45	3,95

5.2.4 Znotrajdnevna in meddnevna točnost

Znotrajdnevno in meddnevno točnost smo določali po postopku, opisanem v poglavju 3.3.3. Znotrajdnevna in meddnevna točnost sta bili za vse vitamine v okviru intervala, ki smo ga določili za mejo sprejemljivosti: 90-110 % (preglednica XXI).

Preglednica XXI: Znotrajdnevna in meddnevna točnost posameznega vitamina (v %)

Konc. (mg/L)	Vit. A	Vit. D ₃	Vit. E	Vit. K ₁
7,5	92,3	92,7	93,2	91,8
75	98,2	104,4	103,8	105,2
200	100,4	100,3	100,2	99,9

Konc. (mg/L)	Vit. A	Vit. D ₃	Vit. E	Vit. K ₁
7,5	93,9	102,2	91,1	98,7
75	93,5	95,4	96,4	92,8
200	94,6	101,5	103,1	99,1

5.2.5 Znotrajdnevna in meddnevna ponovljivost, ponovljivost injiciranja

Znotrajdnevno in meddnevno ponovljivost ter ponovljivost injiciranja smo vrednotili po postopku, opisanem v poglavju 3.3.3. Pri znotrajdnevni in meddnevni ponovljivosti je bil RSD povsod manjši od 5 % (preglednica XXII), kar je v skladu s predpisano mejo sprejemljivosti. RSD ponovljivosti injiciranja je bil v vseh primerih manjši od 1 % (preglednica XXIII), kar je prav tako v skladu s postavljeno specifikacijo.

Preglednica XXII: Znotrajdnevna in meddnevna ponovljivost posameznega vitamina, RSD (%)

Konc. (mg/L)	Vit. A	Vit. D ₃	Vit. E	Vit. K ₁	Konc. (mg/L)	Vit. A	Vit. D ₃	Vit. E	Vit. K ₁
7,5	1,90	0,55	1,83	1,51	7,5	1,11	1,76	3,15	2,60
75	0,44	1,28	1,43	0,30	75	0,72	3,95	3,28	3,77
200	0,35	0,31	0,62	0,44	200	0,66	0,49	0,45	0,37

Preglednica XXIII: Ponovljivost injiciranja, RSD (%)

Konc. (mg/L)	Vit. A	Vit. D ₃	Vit. E	Vit. K ₁
7,5	0,24	0,15	0,20	0,15
75	0,89	0,25	0,43	0,20
200	0,21	0,35	0,16	0,06

5.2.6 Stabilnost

Stabilnost smo določali po postopku, opisanem v poglavju 3.3.3. Koncentracija vitaminov se je spremenila za največ 1,8 % v 24 urah in 3,1 % v 48 urah (preglednica XXIV). Glede na rezultate je stabilnost v metanolu zadovoljiva vsaj 48 ur.

Preglednica XXIV: Stabilnost po 24 in 48 urah (v %)

Konc. (mg/L)	Vit. A 24 h	Vit. A 48 h	Vit. D ₃ 24 h	Vit. D ₃ 48 h	Vit. E 24 h	Vit. E 48 h	Vit. K ₁ 24 h	Vit. K ₁ 48 h
7,5	99,7	99,9	99,4	98,7	99,0	99,4	98,2	96,9
75	98,9	98,9	100,7	99,3	101,7	100,1	100,5	100,3
200	98,7	98,5	99,2	98,7	99,8	99,8	99,6	99,2

Vsi opisani parametri so bili znotraj določenih meja sprejemljivosti. Tako smo potrdili ustreznost razvite analizne metode za vrednotenje izbranih analitov.

5.3. DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA STABILNOST POSAMEZNIH VITAMINOV

Znano je, da so lipofilni vitamini v splošnem precej nestabilni. Njihov razpad je pospešen na kisiku, svetlobi in pri segrevanju. Glavni razlog za to je njihova struktura s konjugiranimi dvojnimi vezmi (28). V stabilnostni študiji raziskovalnega dela smo najprej sistematično raziskali nestabilnost vsakega posameznega vitamina pri različnih pogojih, ki

vplivajo na oksidativno stabilnost. Preverili smo vpliv različnih topil, različnih začetnih koncentracij vitaminov, temperature, UV-svetlobe in oksidantov (vodikov peroksid).

5.3.1 Topila

Vrsta topila je eden od pomembnejših dejavnikov za zagotavljanje primerne stabilnosti spojin v raztopini. Zato smo preverili, kako različna topila vplivajo na posamezne vitamine (priprava vzorcev v poglavju 4.1.1). Njihovo obstojnost smo vrednotili v metanolu, v treh različnih vodnih medijih (MQ, navadni in destilirani vodi) in v mešanici metanola ter vode. Na podlagi rezultatov stabilnosti posameznih vitaminov (preglednica XXV) smo se tudi odločili, katero topilo bomo uporabljali v nadaljevanju stabilnostne študije.

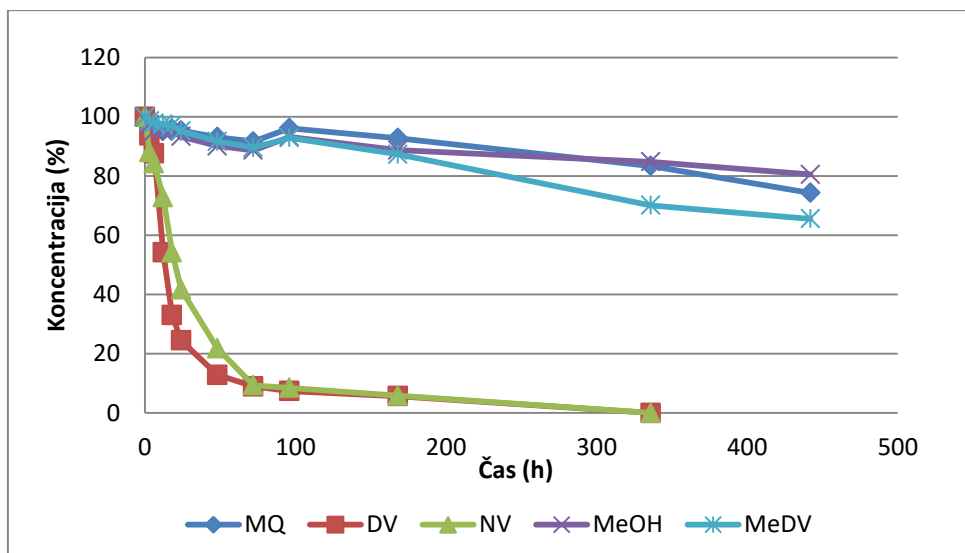
Preglednica XXV: Konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamine v različnih topilih

Topila	$k_{\text{vit. A}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. D3}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. E}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. K1}} (\text{h}^{-1})$
MQ	0,5811	0,0161	0,0017	0,0010
DV	0,6837	0,1901	0,5114	0,0635
NV	0,6233	0,1917	0,2705	0,0328
MeOH	0,0001	0,0001	0,0003	0,0004
MeOH+DV	0,0007	0,1260	0,2635	0,0010

Vsi vitamini so bili najbolj stabilni v metanolu, najmanj pa večinoma v destilirani in navadni vodi. Zaradi več nečistot in kovinskih ionov bi sklepali, da bodo vitamini v navadni vodi najmanj stabilni, vendar vidimo, da ni bilo bistvene razlike v stabilnosti med navadno in destilirano vodo oz. je bila nestabilnost vitaminov v destilirani vodi večinoma celo večja. Izmed vodnih medijev je bila stabilnost vitaminov največja v vodi MQ. Voda MQ je prečiščena s sistemom, ki je sposoben proizvesti ultra čisto vodo. Ta ne vsebuje trdnih delcev, bakterij, pirogenih snovi, nukleaz, proteaz, hormonskih motilcev in organskih snovi za tekočinsko kromatografijo (61).

Najmanj stabilen je bil vitamin A, najbolj pa vitamin K_1 . Pri vitaminu K_1 smo opazili posebnost: po začetnem upadu vsebnosti je prišlo do značilnega zvišanje vsebnosti (po treh oz. štirih dneh) v metanolu, vodi MQ in 50-odstotnem metanolu, nato pa je spet sledil postopen upad koncentracije (slika 9).

Zaradi najprimernejše hitrosti zmanjševanja koncentracije vitaminov s časom in najbolj kontrolirane kakovosti, smo se odločili, da bomo za nadaljevanje študije kot topilo vitaminov uporabljali vodo MQ. Za dodatno ponazoritev slika 9 prikazuje upad koncentracije vitamina K_1 s časom v različnih topilih.



Slika 9: Zmanjševanje koncentracije vitamina K₁ s časom v različnih topilih

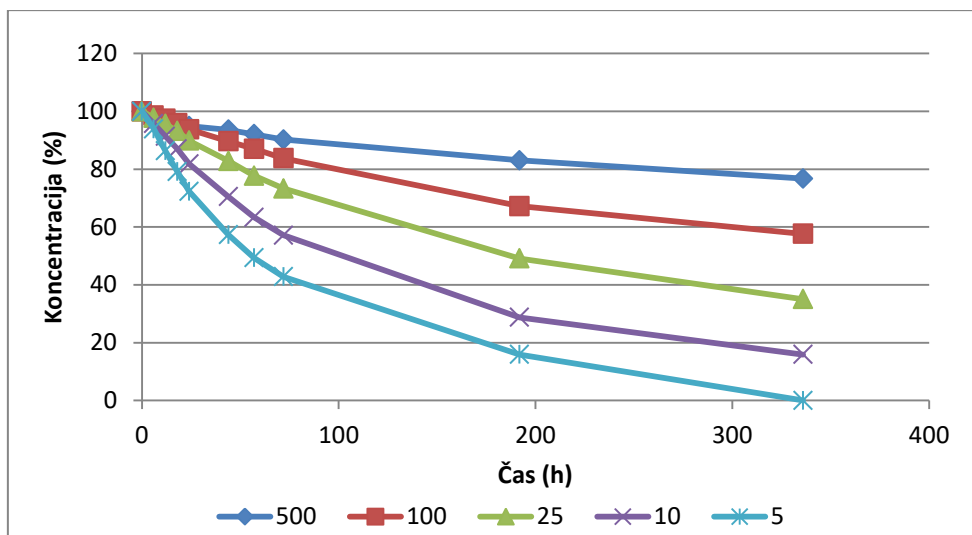
5.3.2 Različne koncentracije

Nestabilnost zaradi oksidacije se spreminja glede na začetno koncentracijo, saj je oksidacija koncentracijsko odvisna. Zato smo preverili, ali se to dogaja pri preučevanih vitaminih. Pripravili smo vzorce vitaminov in opazovali njihovo stabilnost (poglavje 4.2.2). V preglednici XXVI so podani rezultati za vsak posamezen vitamin.

Preglednica XXVI: Konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamine pri različnih začetnih koncentracijah vitaminov

Konc. raztopine (mg/L)	$k_{\text{vit. A}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. D3}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. E}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. K1}} (\text{h}^{-1})$
500	0,3394	0,0244	0,0007	0,0003
100	0,5591	0,0346	0,0021	0,0004
25	0,9583	0,0493	0,0044	0,0005
10	0,9583	0,0438	0,0079	0,0008
5	0,8424	0,0444	0,0120	0,0008

Pri vseh vitaminih opazimo povezavo med koncentracijo in hitrostjo reakcije, manjša kot je koncentracija, večja je nestabilnost. Razlike so najbolj izrazite pri vitaminu E (slika 10), kjer je razmerje med najvišjo in najnižjo konstanto 17. To lahko pripišemo antioksidativnemu delovanju vitamina E. Pri drugih vitaminih je prej omenjeno razmerje nekje med 2 in 3. Na podlagi rezultatov lahko za vse vitamine potrdimo, da začetna koncentracija vpliva na njihovo stabilnost.



Slika 10: Upad koncentracije vitamina E s časom pri različnih začetnih koncentracijah (mg/L)

5.3.3 Temperatura

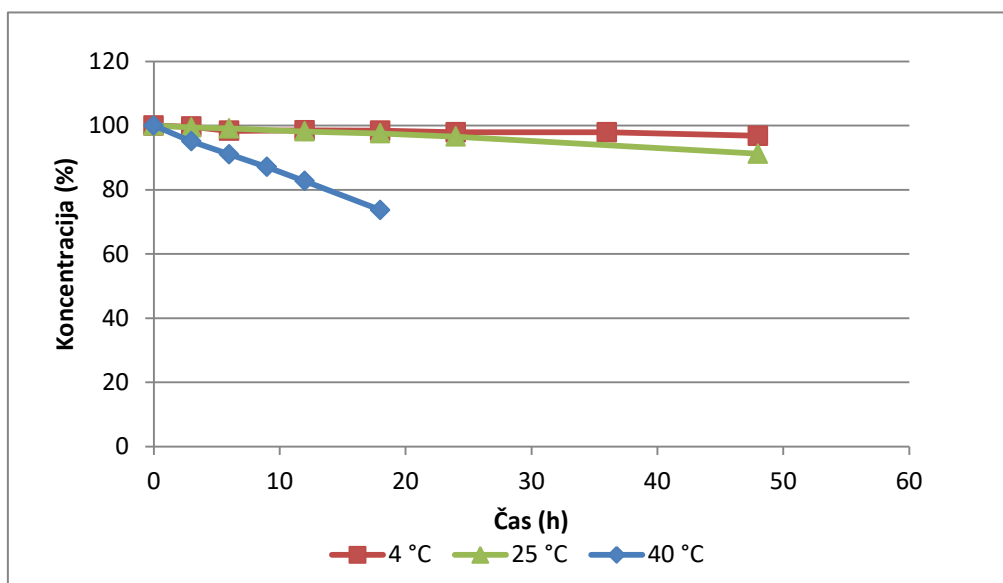
Temperatura je temeljni dejavnik okolja, o katerem je splošno znano, da vpliva na hitrost reakcij oz. na stabilnost. Priprava vzorcev in izvedba poizkusa za vrednotenje vpliva temperature sta opisana v poglavju 4.1.3. Preglednica XXVII prikazuje rezultate za vsak posamezen vitamin.

Preglednica XXVII: Konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamine pri različnih T in Arrheniusova enačba

	Vitamin A	Vitamin D ₃	Vitamin E	Vitamin K ₁
k (4 °C) (h ⁻¹)	0,3606	0,0001	0,0006	0,0013
k (25 °C) (h ⁻¹)	0,5811	0,0161	0,0017	0,0021
k (40 °C) (h ⁻¹)	1,4129	0,0613	0,0166	0,0041
enačba Arrheniusove premice	$y = -3161x + 10,46$	$y = -15448x + 47,00$	$y = -7880x + 20,70$	$y = -2691x + 3,02$
R ²	0,9118	0,9645	0,9033	0,9512
Ea (kJ/mol)	26,28	128,43	65,52	22,38

Povsod opazimo povezavo med hitrostjo reakcije in temperaturo – vitamini so manj stabilni pri povišani temperaturi. Nizka temperatura je najbolj stabilizirala vitamin D₃, kjer je bilo razmerje konstant pri 25 in 4 °C kar 161, pri drugih vitaminih je bilo to razmerje le okoli 2. Visoka temperatura je najbolj zmanjšala stabilnost vitaminu E (razmerje konstant med 40 in 25 °C je 9) (slika 11), drugim vitaminom pa manj (razmerje konstant od 2 do 4). Arrheniusova enačba pomeni kvantitativno povezavo med hitrostjo reakcije in recipročno vrednostjo temperature in je podlaga za pospešene teste stabilnosti (če je veljavna, jo

uporabljamo za napovedovanje stabilnosti) (59). Velja tudi za preučevane vitamine, saj je determinacijski koeficient linearne zveze dokaj visok (preglednica XXVII). Različne aktivacijske energije vitaminov, izračunane iz naklonov posameznih Arrheniusovih premic, kažejo različno občutljivost stabilnosti vitaminov na temperaturo. Zaključimo lahko, da ima temperatura na preučevane vitamine velik vpliv, pri višji temperaturi se stabilnost zmanjšuje.



Slika 11: Zmanjševanje koncentracije vitamina E s časom pri različnih temperaturah

5.3.4 UV-svetloba

Tudi UV-svetloba je eden temeljnih dejavnikov okolja, ki vpliva na stabilnost. Za preučevane vitamine je znano, da so na svetlobi precej labilni. Ker so dostopni podatki o vplivu svetlobe deloma protislovni, smo preverili tudi ta dejavnik. Pripravili smo vzorce vitaminov (poglavje 4.1.3) in jih izpostavili UV-svetlobi. Preglednica XXVIII prikazuje konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamine pri izpostavljenosti UV-svetlobi in zaščiti pred njo.

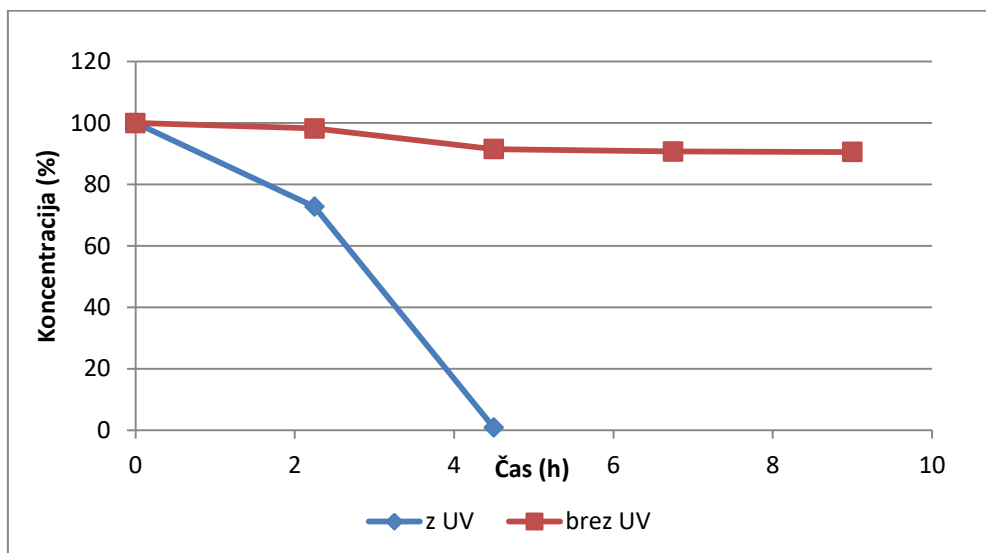
Preglednica XXVIII: Konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamine na UV-svetlobi

Izpostavljenost	$k_{\text{vit. A}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{vit. D3}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{vit. E}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{vit. K1}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$
UV	3,2283	0,0350	0,0092	1,0583
zaščita pred UV	1,0287	0,0050	0,0015	0,0123

UV-svetloba je imela vpliv na stabilnost vseh vitaminov. Na svetlobi je najbolj nestabilen vitamin K_1 (slika 12), pri katerem je bilo razmerje konstant v transparentni viali in viali,

zaščiteni pred svetlobo, kar 86. Vpliv svetlobe na stabilnost vitamina E in vitamina D₃ je bil podoben (razmerje 7 in 6), najmanjši vpliv svetlobe pa smo opazili pri vitaminu A, ki je že drugače zelo nestabilen.

Transparentno vialo in vialo, zaščiten pred svetlobo, smo imeli na istem mestu, in sicer tam, kjer je skozi okno močno sijalo poletno sonce. Zato je na razpad deloma vplivala tudi temperatura. Ne glede na to, so pri vseh vitaminih vidne značilne razlike v nestabilnosti zaradi delovanja svetlobe.



Slika 12: Upadanje koncentracije vitamina K₁ s časom na UV-svetlobi

5.3.5 Oksidanti – vodikov peroksid

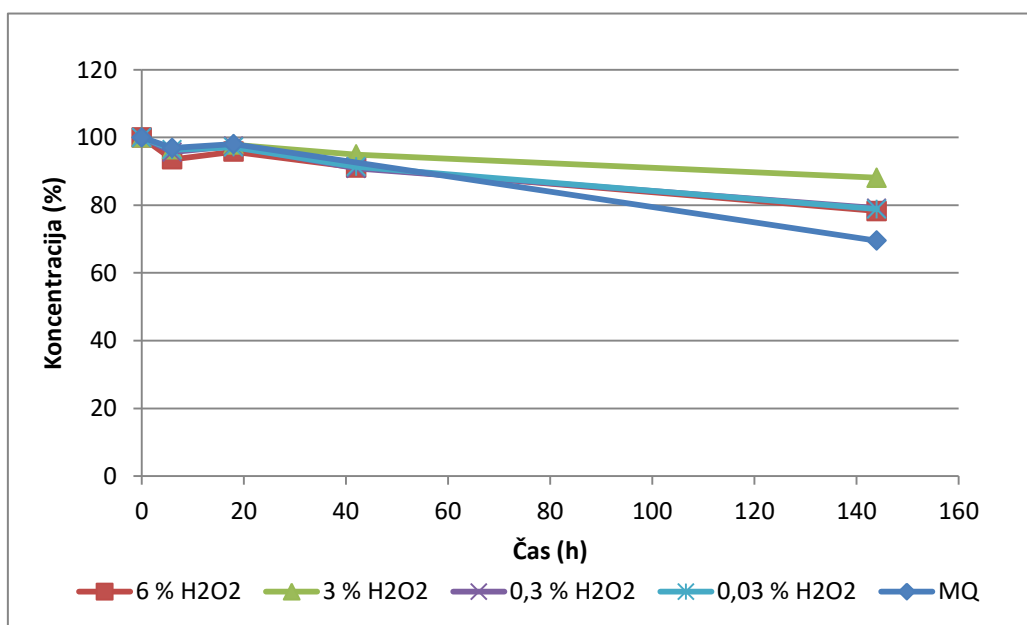
Oksidanti se lahko nahajajo v naravnem okolju in vplivajo na stabilnost spojin. Pri lipofilnih vitaminih pride do nestabilnosti zaradi oksidacije konjugiranih dvojnih vezi (28). Pripravili smo vzorce vitaminov z vodikovim peroksidom (poglavje 4.1.4) in preverjali, kako so vitamini dovzetni za oksidacijo. V preglednici XXIX so prikazani rezultati za posamezen vitamin v konstantah reakcijske hitrosti 1. reda.

Preglednica XXIX: Konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamine ob dodatku H₂O₂

koncentracija H ₂ O ₂	k _{vit. A} (h ⁻¹)	k _{vit. D₃} (h ⁻¹)	k _{vit. E} (h ⁻¹)	k _{vit. K₁} (h ⁻¹)
6 %	1,0259	0,0069	0,0383	0,0014
3 %	0,9096	0,0089	0,0827	0,0007
0,3 %	0,7517	0,0228	0,0076	0,0015
0,03 %	0,5207	0,0522	0,0171	0,0015
0 %	1,2900	0,0587	0,0169	0,0025

Različna koncentracija vodikovega peroksida je na vsak posamezen vitamin vplivala drugače (preglednica XXIX), skoraj nikjer pa ni bilo opaziti večje nestabilnosti v primerjavi z vodo MQ. Splošno gledano so bili vsi vitamini najbolj stabilizirani pri dodatku vodikovega peroksida s koncentracijo med 0,03 in 3 %. Pri vitaminu K₁ smo še enkrat opazili značilen porast koncentracije v kasnejši časovni točki, nato je sledilo ponovno upadanje koncentracije.

Vodikov peroksid je oksidant oz. ima oksidativno delovanje, zato smo predvidevali, da bodo vitamini v njegovi prisotnosti bolj nestabilni. Vendar pa smo dobili presenetljive rezultate, saj so bili skoraj vsi bolj nestabilni v čisti vodi MQ (vidno na sliki 13, ki prikazuje vitamin K₁). Do podobnih rezultatov so prišli že v prejšnji študiji, kjer so vrednotili stabilnost vitamina D₃ (60).



Slika 13: Upadanje koncentracije vitamina K₁ s časom ob dodatku H₂O₂ različnih koncentracij

5.4 STABILIZACIJA POSAMEZNIH VITAMINOV S STABILIZATORJI

Po vrednotenju različnih dejavnikov smo ugotovili, da medij, temperatura, UV-svetloba in različne koncentracije vitaminov dejansko vplivajo na stabilnost vitaminov. Zato je pri oblikovanju vitaminov v primerno farmacevtsko obliko in pri njihovem shranjevanju potrebna ustrezna stabilizacija – izogibati se dejavnikom destabilizacije in/ali aktivno posegati z antioksidanti. Za preverjanje drugega pristopa stabilizacije vitaminov smo

raztopinam posameznih vitaminov dodali dva stabilizatorja, AK ter EDTA, ki sta učinkovita in uveljavljena antioksidanta.

5.4.1 Dodatek askorbinske kisline

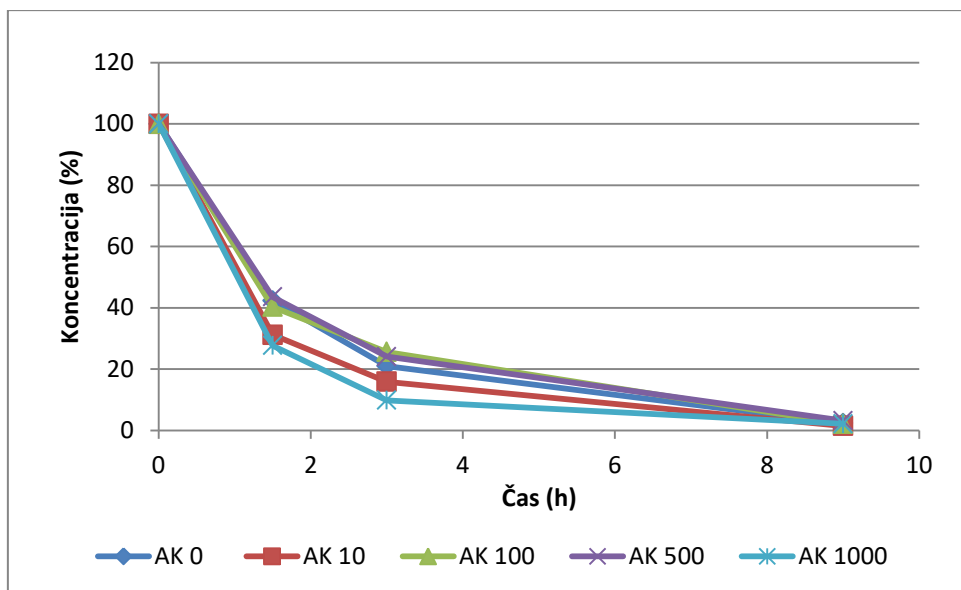
AK je vodotopen vitamin, ki ima dokazano učinkovito antioksidativno delovanje in se pogosto uporablja za stabilizacijo. Zaradi antioksidativnega delovanja ima pomembno vlogo tudi pri zaščitnih mehanizmih v celicah in tkivih (5). Preučevanim vitaminom smo jo dodali v različnih koncentracijah, kot je opisano v poglavju 4.1.5, in opazovali njihovo stabilnost (preglednica XXX).

Preglednica XXX: Konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamine ob dodatku AK

Koncentracija AK (mg/L)	$k_{\text{vit. A}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. D}_3} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. E}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. K}_1} (\text{h}^{-1})$
0	0,5203	0,0117	0,0038	0,0042
10	0,4492	0,0142	0,0015	0,0048
100	0,4168	0,0191	0,0037	0,0013
500	0,3702	0,0163	0,0069	0,0098
1000	0,7739	0,0188	0,0236	0,0187

AK je vitamine A (slika 14), E in K_1 nekoliko stabilizirala samo pri posameznih manjših koncentracijah, pri večjih koncentracijah pa so bili vitamini ponovno nestabilni. Pri vitaminu D_3 AK ni izkazovala stabilizirajočega učinka.

Rezultati niso v skladu z našimi pričakovanji, saj smo predvidevali, da bo AK bolj izrazito stabilizirala vitamine. Podobne rezultate pa so dobili že v poprejšnjih stabilnostnih študijah vitaminov (60).



Slika 14: Upadanje koncentracije vitamina A s časom ob dodatku AK v različnih koncentracijah (mg/L)

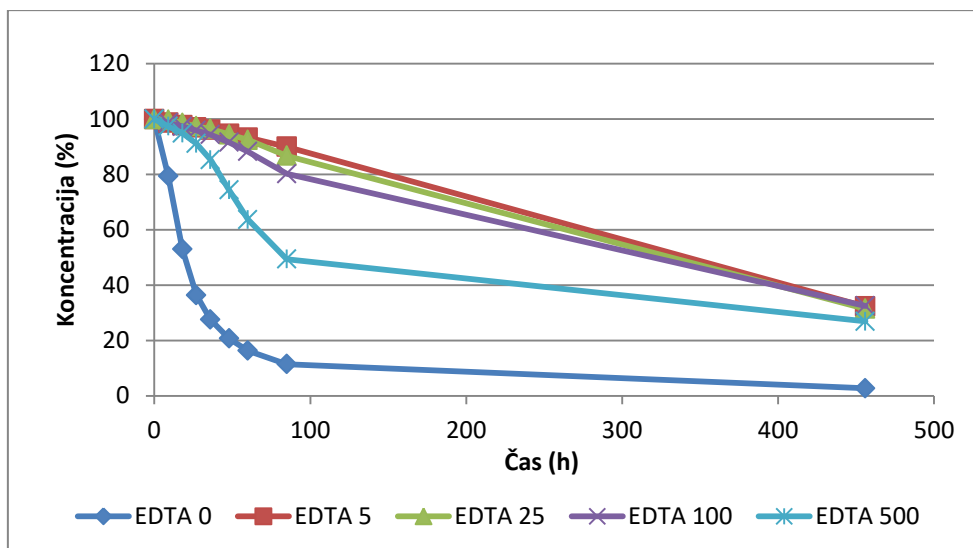
5.4.2 Dodatek EDTA

EDTA je razširjen antioksidant, ki kelira kovinske ione, kot sta Fe^{3+} in Ca^{2+} , in tako preprečuje njihovo katalitično delovanje. Dodali smo ga vzorcem preučevanih vitaminov (po postopku iz poglavja 4.1.6) in ugotavljali stopnjo stabilizacije (preglednica XXXI).

Preglednica XXXI: Konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamine ob dodatku EDTA

Koncentracija EDTA (mg/L)	$k_{\text{vit. A}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. D}_3} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. E}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. K}_1} (\text{h}^{-1})$
0	0,3010	0,0266	0,0261	0,0045
5	0,2248	0,0012	0,0004	0,0007
25	0,2161	0,0017	0,0003	0,0002
100	0,2188	0,0025	0,0001	0,0014
500	0,2886	0,0086	0,0005	0,0072

Raztopine EDTA so že v najnižji koncentraciji bistveno stabilizirale vitamine D_3 (slika 15), E in K_1 , pri vitaminu A pa je bila opazna manjša razlika. To pomeni, da kovinski ioni pri oksidaciji vitamina A sodelujejo v manjši meri in je očitno prednostni mehanizem oksidacije drugačen. Največja stabilizacija je bila opazna pri vitaminu E. Do določene koncentracije EDTA se je stabilnost vitaminov povečevala, pri najvišjih koncentracijah EDTA pa je bila stabilnost spet manjša, vendar še vedno boljše kot v odsotnosti EDTA.



Slika 15: Upad koncentracije vitamina D₃ s časom ob dodatku štirih različnih koncentracij EDTA (mg/L)

5.4.3 Dodatek EDTA in askorbinske kisline

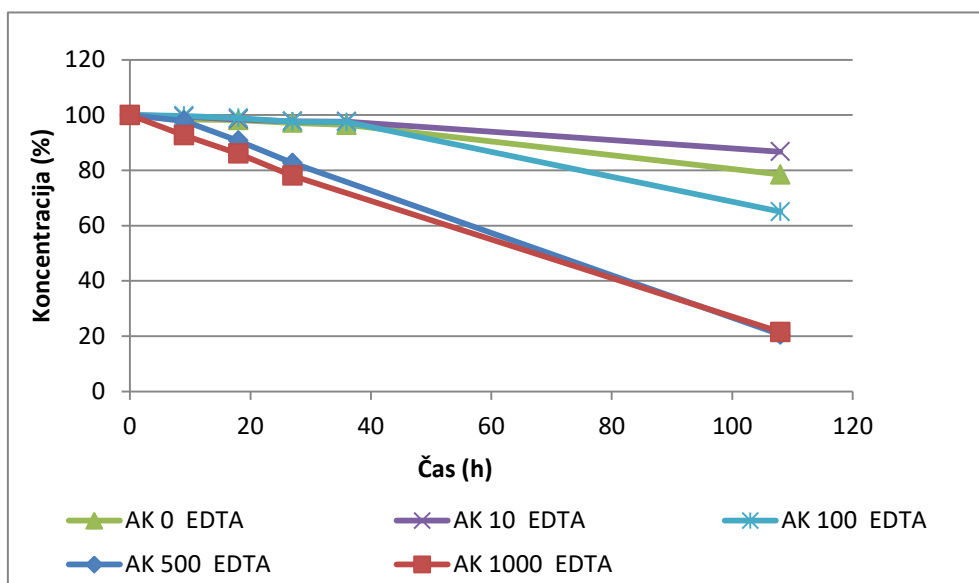
EDTA in askorbinska kislina sta razširjena antioksidanta, ki stabilizirata spojine po dveh mehanizmih. Prvi kelira kovinske ione, drugi reagira z radikali. V poglavjih 5.4.1 in 5.4.2 smo opazili, da je dodatek vsakega antioksidanta posebej stabiliziral preučevane vitamine, čeprav vitamin A v majhni meri. Stabilizacija je bila pri dodatku EDTA sicer večja kot pri AK, vendar smo se odločili, da raztopinam vitaminov kljub temu dodamo obe spojini in ugotovimo, ali je stabilizacija pri tem še močnejša (preglednica XXXII).

Koncentracija EDTA v raztopini je bila konstantna, in sicer 25 mg/L. Izbrali smo jo na podlagi prejšnjih rezultatov, saj je najbolj stabilizirala raztopine vitaminov. Koncentracijo AK v raztopini pa smo spreminjali od 0 do 1000 mg/L. Vzorce smo pripravili po postopku iz poglavja 4.1.7.

Preglednica XXXII: Konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamine pri dodatku različnih koncentracij AK

Koncentracija AK (mg/L) ob konstantnem dodatku EDTA (25 mg/L)	$k_{\text{vit. A}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. D}_3} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. E}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. K}_1} (\text{h}^{-1})$
0	0,2434	0,0023	0,0008	0,0006
10	0,3095	0,0013	0,0009	0,0013
100	0,4148	0,0042	0,0021	0,0006
500	0,4770	0,0155	0,0042	0,0043
1000	0,4434	0,0148	0,0059	0,0087

Dodatek AK raztopini EDTA ni prispeval k stabilizaciji vitaminov, kar ponazarja tudi slika 16, ki prikazuje vitamin D₃. Vitamin A je dodatek pravzaprav celo destabiliziral. Drugi vitamini so bili približno enako stabilni s samo EDTA kot pri dodatku manjše koncentracije AK in manj stabilni v prisotnosti večjih koncentracij AK. V primerjavi z rezultati, kjer smo v vzorce dodajali le AK (preglednica XXX), so bili vitamini stabilnejši, ko je bil AK dodan še EDTA (preglednica XXXIII).



Slika 16: Zmanjševanje koncentracije vitamina D₃ ob dodatku EDTA in AK različnih koncentracij (mg/L)

5.5 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA STABILNOST PRI KOMBINACIJAH VITAMINOV

V poprejšnjih študijah so večinoma preučevali stabilnost posameznih vitaminov (9, 29-33). V farmacevtskih pripravkih pa se največkrat pojavljajo različne kombinacije vitaminov (multivitaminski pripravki), zato je pomembno raziskati tudi stabilnost vitaminov v kombinacijah z drugimi vitamini oz. njihove medsebojne interakcije. Pripravili smo raztopine različnih kombinacij vitaminov z različnimi topili (poglavje 4.2) in opazovali medsebojne interakcije, nato pa smo preverjali še vpliv različnih koncentracij nekaterih posameznih vitaminov na druge. Tudi pri kombinacijah vitaminov smo raziskovali vpliv nekaterih dejavnikov, kot že poprej za posamezne vitamine v poglavju 5.3.

5.5.1 Posamezna topila

Raztopine vseh možnih kombinacij vitaminov smo pripravili v vodi MQ in navadni vodi ter v metanolu (poglavje 4.2.1), saj smo hoteli ugotoviti, kako vitamini vplivajo drug na drugega in kako nanje vplivajo različna topila.

- VODA MILLIQ

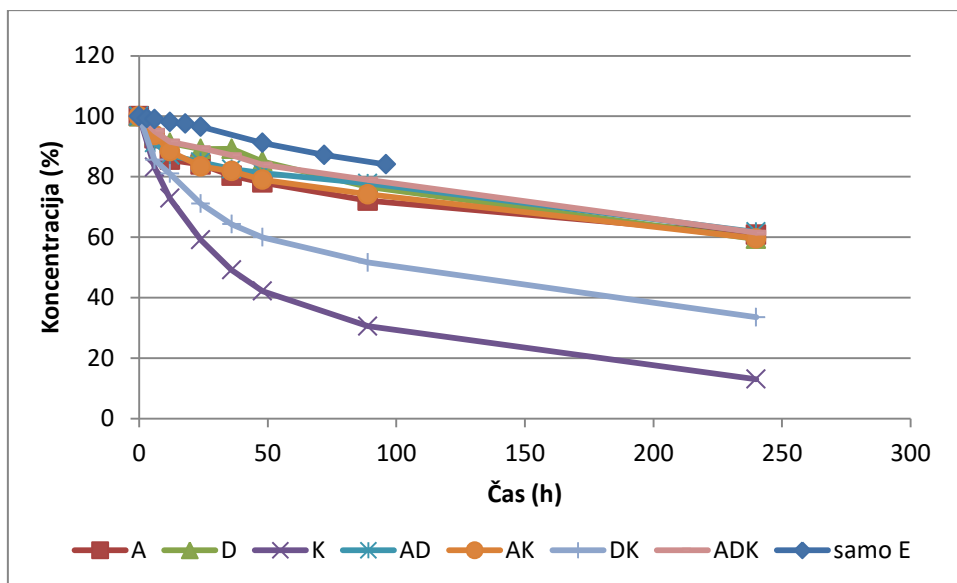
Kombinacije vitaminov smo pripravili po postopku, opisanem v poglavju 4.2.1. Preglednica XXXIII prikazuje konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamine v vodi MQ.

Preglednica XXXIV: Konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamine v kombinacijah v vodi MQ

Vitamini v raztopini	$k_{\text{vit. A}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. D}_3} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. E}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. K}_1} (\text{h}^{-1})$
A, D ₃	0,0871	0,0063	/	/
A, E	0,0291	/	0,0047	/
A, K ₁	0,0389	/	/	0,0007
D ₃ , E	/	0,0010	0,0020	/
D ₃ , K ₁	/	0,0140	/	0,0008
E, K ₁	/	/	0,0175	0,0007
A, D ₃ , E	0,0209	0,0006	0,0017	/
A, D ₃ , K ₁	0,0317	0,0028	/	0,0008
A, E, K ₁	0,0289	/	0,0075	0,0003
D ₃ , E, K ₁	/	0,0031	0,0101	0,0003
A, D ₃ , E, K ₁	0,0188	0,0007	0,0033	0,0010
posamezen vitamin	0,5811	0,0161	0,0037	0,0010

Stabilnost vitaminov je bila večinoma najmanjša v raztopini, kjer je bil v vodi MQ le posamezen vitamin. Skoraj v vseh kombinacijah je bila hitost reakcije manjša, kar pomeni, da jih je prisotnost drugih vitaminov stabilizirala. Večja stabilizacija se je pojavila pri vitaminu A in D₃. Ta dva vitamina sta bila najbolj stabilna v raztopini z vsemi štirimi vitamini – A, D₃, E, K₁ – in v raztopini kombinacije vitaminov A, D₃, E; prav tako je bil v tej najbolj stabilen vitamin E (slika 17). Prisotnost drugih vitaminov je vitamina E in K₁ stabilizirala manj in samo v nekaterih kombinacijah. Opazili smo tudi, da je vitamin K₁ ponavadi nekoliko destabiliziral vitamin E.

Glede na rezultate lahko rečemo, da so se vitamini med seboj stabilizirali. Stabilizacija je bila večinoma večja, ko je bilo prisotnih več vitaminov. Destabilizacijo smo opazili pri vitaminu E, ko je bil v raztopini prisoten vitamin K₁.

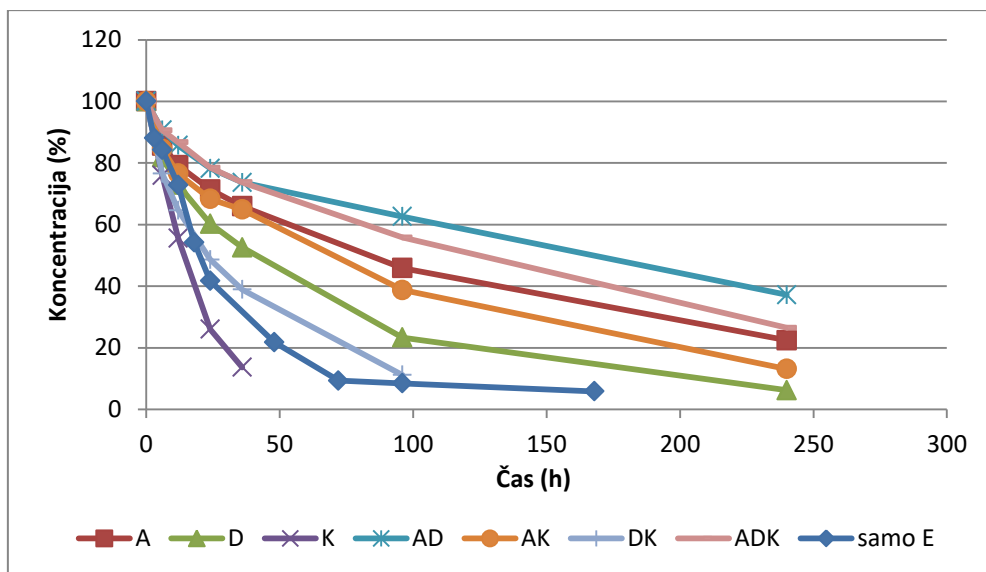


Slika 17: Zmanjševanje koncentracije vitamina E s časom v kombinacijah z drugimi vitamini

- NAVADNA VODA

Vodovodna voda vsebuje veliko več nečistot in kovinskih ionov kot voda MQ, zato smo preverili medsebojne interakcije med vitamini tudi v tem vodnem mediju. Rastopine vseh kombinacij vitaminov smo pripravili z navadno vodo po enakem postopku kot vzorce z vodo MQ (poglavje 4.2.1). Vitamini so bili v kombinacijah z drugimi večinoma veliko stabilnejši. Stabilnost je bila najboljša, ko so bili prisotni vsi štirje vitamini ali v kateri od kombinacij, kjer so bili prisotni trije. Izjema je bil vitamin E v prisotnosti vitamina K₁, kjer ga je ta destabiliziral (slika 18).

Kvalitativno je stabilizacija primerljiva tisti v vodi MQ, saj so bili v navadni vodi vitamini najbolj stabilizirani pri večinoma enakih kombinacijah. Je pa opazna kvantitativna razlika v stabilnosti pri obeh medijih, saj so skoraj vse kombinacije stabilnejše v vodi MQ. Najmanjša razlika je bila opazna pri vitaminu A, največja pa pri vitaminih D₃ in K₁, ki sta v vodi MQ veliko bolj stabilna.



Slika 18: Zmanjševanje koncentracije vitamina E v kombinacijah vitaminov v navadni vodi

- METANOL

V poglavju 5.3.1 smo podali rezultate s posameznimi vitamini v metanolu, sedaj pa smo raziskali še medsebojno učinkovanje vitaminov v kombinacijah z drugimi. Raztopine smo pripravili po postopku v poglavju 4.2.1. Preglednica XXXIV prikazuje konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamine v kombinacijah.

Preglednica XXXV: Konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamine v kombinacijah v metanolu

Vitamini v raztopini	$k_{\text{vit. A}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. D}_3} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. E}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. K}_1} (\text{h}^{-1})$
A, D ₃	0,0006	0,00049	/	/
A, E	0,0007	/	0,0008	/
A, K ₁	0,0002	/	/	0,0007
D ₃ , E	/	0,00054	0,0008	/
D ₃ , K ₁	/	0,00047	/	0,0014
E, K ₁	/	/	0,0002	0,0011
A, D ₃ , E	0,0005	0,00044	0,0007	/
A, D ₃ , K ₁	0,0003	0,00047	/	0,0017
A, E, K ₁	0,0001	/	0,00002	0,0003
D ₃ , E, K ₁	/	0,00051	0,0006	0,0015
A, D ₃ , E, K ₁	0,0001	0,00039	0,0001	0,0010
posamezen vitamin	0,0015	0,00047	0,0005	0,0081

Splošno so bili vitamini v metanolu veliko stabilnejši kot v vodnem mediju, kar je tudi v skladu s prejšnjimi rezultati (poglavje 5.3.1). V času, ko smo študijo izvajali, so bile zato spremembe v koncentraciji vitaminov pri tem topilu manj opazne. Trend stabilizacije je bil

precej podoben trendu pri raztopinah z vodo MQ. V kombinacijah vitaminov je bila stabilnost vsakega še boljša, maksimum je dosegla takrat, ko so bili prisotni vsi štirje vitamini.

5.5.2 Različne koncentracije vitamina E

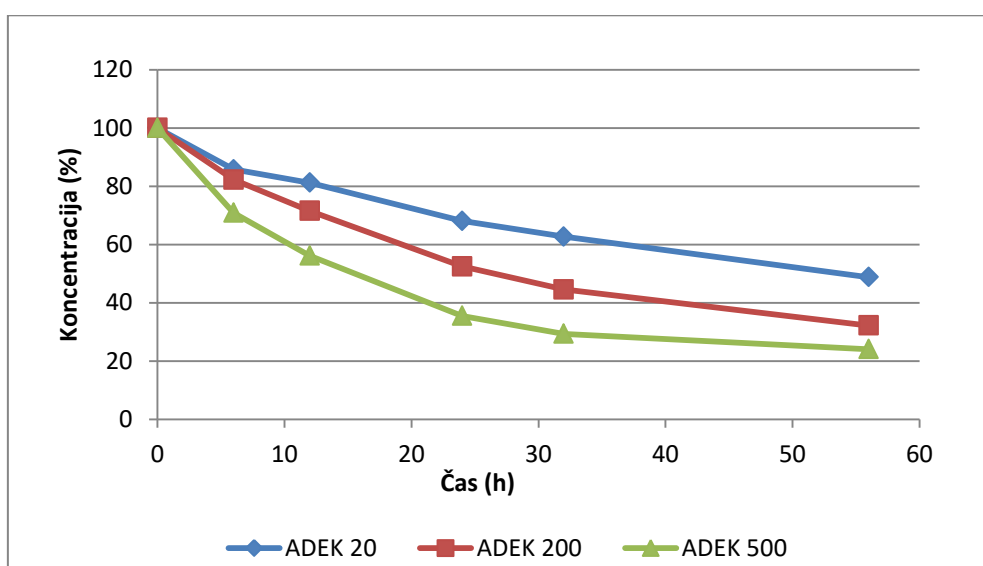
Vitamin E je znan antioksidant, ki se uporablja tudi kot stabilizator. V poglavju 5.5.1 smo opazili, da je vitamin E stabiliziral druge vitamine. Zato smo ob dodatku treh različnih koncentracij vitamina E želeli bolj sistematično preveriti ta vpliv. Pripravili smo raztopine vseh kombinacij z vitaminom E, kjer smo spreminjali njegovo koncentracijo (poglavje 4.2.2). Drugi vitamini so imeli v vseh raztopinah konstantno začetno koncentracijo. Preglednica XXXV prikazuje konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamine v kombinacijah.

Preglednica XXXVI: Konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamine v kombinacijah ob treh različnih konc. vitamina E

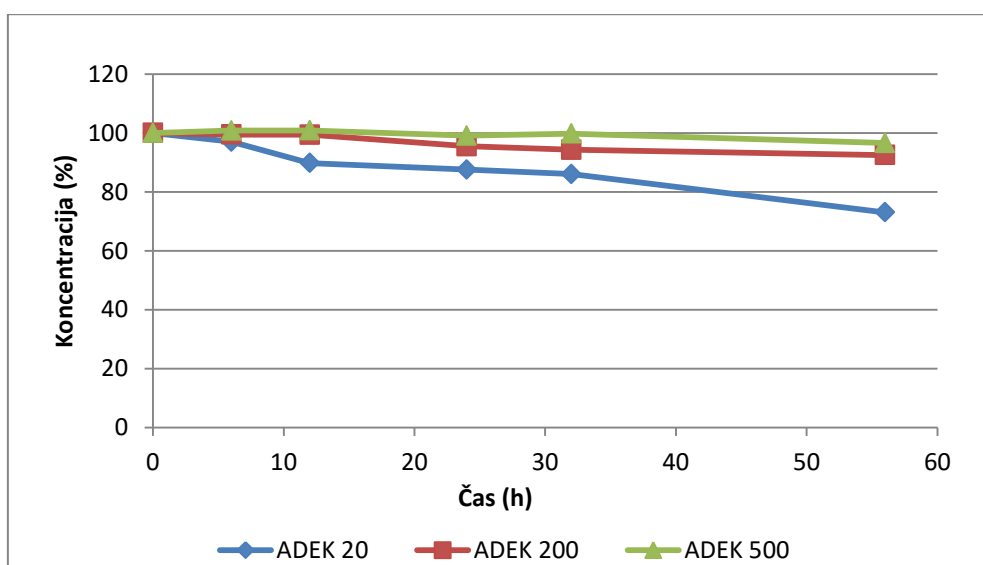
Kombinacije vit. z različno koncentracijo vit. E (mg/L)	$k_{\text{vit. A}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. D}_3} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. E}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. K}_1} (\text{h}^{-1})$
E 20	/	/	0,0092	/
E 200	/	/	0,0043	/
E 500	/	/	0,0037	/
A, E 20	0,0450	/	0,0083	/
A, E 200	0,0366	/	0,0019	/
A, E 500	0,0326	/	0,0011	/
D ₃ , E 20	/	0,0011	0,0024	/
D ₃ , E 200	/	0,0026	0,0041	/
D ₃ , E 500	/	0,0032	0,0039	/
K ₁ , E 20	/	/	0,0113	0,0012
K ₁ , E 200	/	/	0,0041	0,0007
K ₁ , E 500	/	/	0,0041	0,0006
A, D ₃ , E 20	0,0110	0,0007	0,0023	/
A, D ₃ , E 200	0,0209	0,0008	0,0016	/
A, D ₃ , E 500	0,0384	0,0009	0,0013	/
A, K ₁ , E 20	0,0142	/	0,0037	0,0034
A, K ₁ , E 200	0,0254	/	0,0025	0,0027
A, K ₁ , E 500	0,0600	/	0,0015	0,0009
D ₃ , K ₁ , E 20	/	0,0019	0,0069	0,0007
D ₃ , K ₁ , E 200	/	0,0031	0,0052	0,0012
D ₃ , K ₁ , E 500	/	0,0039	0,0050	0,0012
A, D ₃ , K ₁ , E 20	0,0124	0,0006	0,0053	0,0004
A, D ₃ , K ₁ , E 200	0,0251	0,0008	0,0016	0,0003
A, D ₃ , K ₁ , E 500	0,0253	0,0009	0,0007	0,0002
posamezen vitamin	0,5811	0,0170	/	0,0010

Vitamin E je stabiliziral vse vitamine, vendar različne koncentracije vitamina E niso dosti vplivale na stabilizacijo ostalih vitaminov. Zadostovala je že koncentracija 20 mg/L (slika 19), razen pri vitaminu K₁ je bilo opazno večanje stabilnosti z večanjem koncentracije vitamina E. Stabilnost vitamina E je bila pri skoraj vseh kombinacijah vitaminov v raztopinah z začetno koncentracijo vitamina E 20 mg/L manjša kot v raztopinah večjih koncentracij vitamina E (slika 20).

Vitamin E je stabilizator – antioksidant. Zato smo predvidevali, da bo stabiliziral druge vitamine. Že v prejšnjih poglavjih smo opazili tako tendenco, v tem poglavju pa smo to potrdili – vitamin E je stabiliziral vse vitamine, večino najbolj že pri koncentraciji 20 mg/L.



Slika 19: Upad vitamina A v kombinaciji z vitamini D₃, E in K₁ ob treh različnih koncentracijah vitamina E (mg/L)



Slika 20: Upad vitamina E pri treh različnih koncentracijah (mg/L) v kombinaciji z vitamini A, D₃ in K₁

5.5.3 Različne koncentracije vitamina K₁

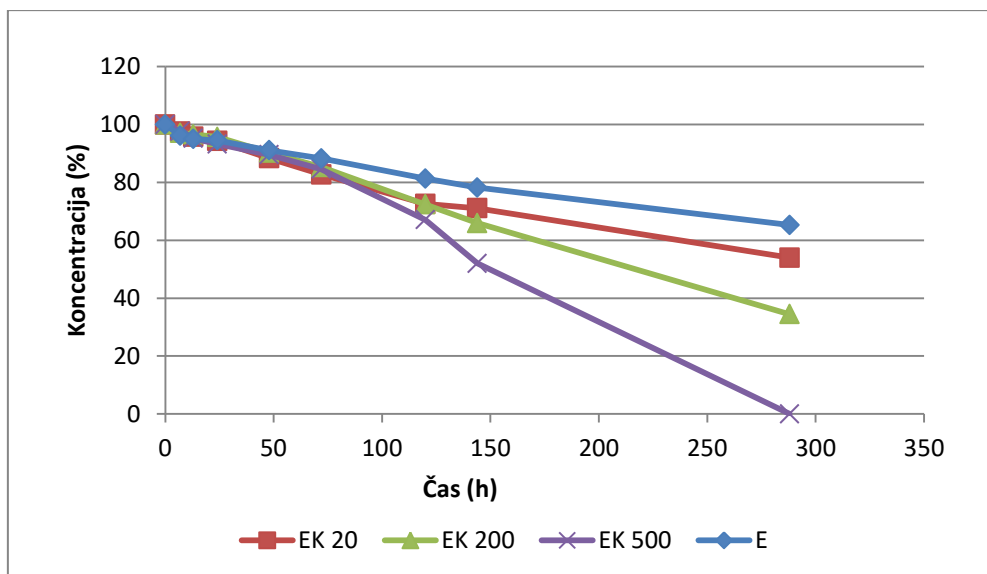
V prejšnjih poglavjih smo opazili, da je vitamin K₁ nekoliko destabiliziral vitamin E. Zato smo hoteli še enkrat preveriti, ali to drži in kako nanj vpliva različna koncentracija vitamina K₁. Pripravili smo raztopine vitaminov E in K₁ (poglavje 4.2.3) s tremi različnimi koncentracijami vitamina K₁. Preglednica XXXVI prikazuje konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamina E in K₁.

Preglednica XXXVII: Konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamina E in K₁ ob treh različnih koncentracijah vitamina K₁

Kombinacije vit. ob treh različnih konc. vit. K ₁ (mg/L)	k _{vit. K₁} (h ⁻¹)	k _{vit. E} (h ⁻¹)
K ₁ 20	0,0008	/
K ₁ 200	0,0008	/
K ₁ 500	0,0004	/
E, K ₁ 20	0,0007	0,0022
E, K ₁ 200	0,0006	0,0030
E, K ₁ 500	0,0005	0,0041
E	/	0,0014

Vitamin E je bil bolj stabilen, če ni bil v kombinaciji z vitaminom K₁. Torej je vitamin K₁ nekoliko destabiliziral vitamin E (preglednica XXXVI, slika 21). Večja kot je bila koncentracija vitamina K₁, manjša je bila stabilnost vitamina E. Opazovali smo tudi, kaj se je dogajalo z vitaminom K₁ in ugotovili, da je bila stabilnost vitamina K₁ nekoliko boljša pri večji začetni koncentraciji vitamina K₁.

V tem poglavju smo potrdili, da je bil vitamin E v prisotnosti vitamina K₁ manj stabilen, vitamin E pa je stabiliziral vitamin K₁ le minimalno.



Slika 21: Zmanjševanje koncentracije vitamina E v prisotnosti vitamina K₁ ob treh različnih koncentracijah (mg/L)

5.6 STABILIZACIJA KOMBINACIJ VITAMINOV Z EDTA

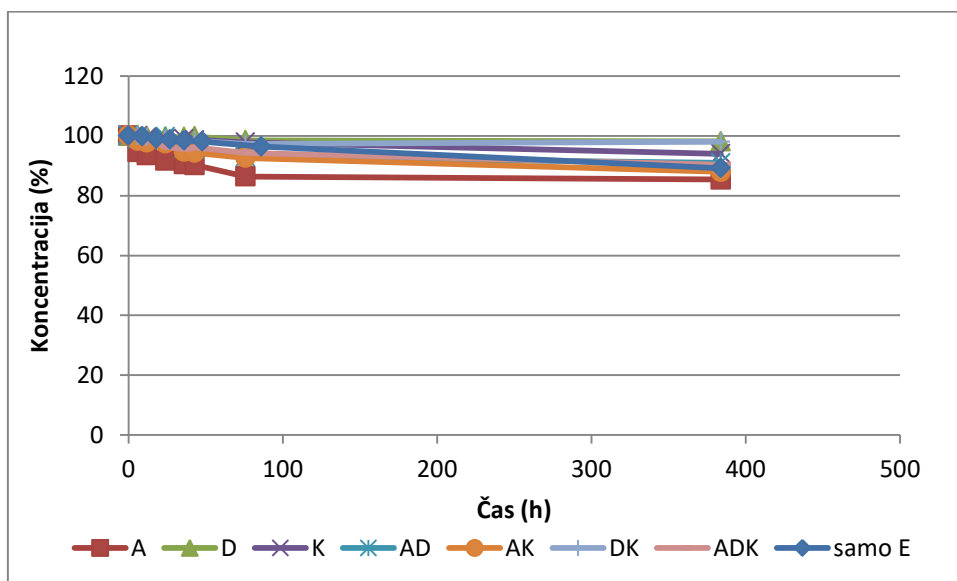
V nadaljevanju smo preizkusili, ali so tudi kombinacije vitaminov stabilnejše, če jim dodamo stabilizator – antioksidant EDTA. Posameznim kombinacijam vitaminov smo dodali EDTA v koncentraciji 25 mg/L (postopek priprave v poglavju 4.2.4). Opazovali smo obnašanje posameznih vitaminov v vseh kombinacijah, ki jim je bila dodana EDTA. Preglednica XXXVII prikazuje konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamine v kombinacijah ob dodatku EDTA.

Preglednica XXXVIII: Konstante reakcijske hitrosti 1. reda za vitamine v kombinacijah ob dodatku EDTA

Kombinacije vit. ob enakem dodatku EDTA	$k_{\text{vit. A}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. D}_3} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. E}} (\text{h}^{-1})$	$k_{\text{vit. K}_1} (\text{h}^{-1})$
A, D ₃	0,0360	0,0036	/	/
A, E	0,0144	/	0,0016	/
A, K ₁	0,0086	/	/	0,0004
D ₃ , E	/	0,0008	0,0002	/
D ₃ , K ₁	/	0,0009	/	0,0006
E, K ₁	/	/	0,0003	0,0003
A, D ₃ , E	0,0060	0,0006	0,0010	/
A, D ₃ , K ₁	0,0095	0,0015	/	0,0005
A, E, K ₁	0,0089	/	0,0010	0,0006
D ₃ , E, K ₁	/	0,0009	0,0004	0,0003
A, D ₃ , E, K ₁	0,0045	0,0008	0,0008	0,0001
posamezen vitamin	0,2160	0,0017	0,0003	0,0002

Dodatek EDTA je tako kot posamezne vitamine (poglavje 5.4.2) stabiliziral tudi kombinacije vitaminov. Trend stabilizacij je bil pri posameznih vitaminih zelo podoben, največja stabilizacija se je pokazala pri vitaminu E, najmanjša pa pri vitaminu A. Če primerjamo kombinacije brez dodatka EDTA (preglednica XXXIII) s temi, ki jim je bila EDTA dodana, je bila razlika velika pri vitaminu E (razmerje konstant od 2 do 58 za različne kombinacije), nekoliko manjša, a še zmeraj precejšnja, pri vitaminih D₃ (razmerje konstant od 2 do 9), K₁ (razmerje konstant od 2 do 7) in A (razmerje konstant od 2 do 4). Opazna je bila tudi zelo velika razlika med raztopinami z dodatkom EDTA in brez njega, ko so bili posamezni vitamini A, D₃ in E v kombinaciji z vitaminom K₁. Z dodatkom EDTA so bili veliko stabilnejši. Kombinacije z drugimi vitamini, tako z dodatkom EDTA kot brez njega, so najbolj stabilizirale vitamin A, nekoliko manj vitamin D₃, vitamin K₁ in vitamin E pa so stabilizirale malo in le v določenih kombinacijah (slika 22 prikazuje vitamin E).

Če primerjamo kombinacije vitaminov z dodatkom EDTA in brez njega, opazimo, da so bili vsi vitamini v kombinacijah z drugimi v prisotnosti EDTA še stabilnejši. Največja sprememba je bila vidna pri vitaminu E.



Slika 22: Upad koncentracije vitamina E s časom v vseh kombinacijah z drugimi vitamini in dodatkom EDTA

6. SKLEP

- Razvili smo stabilnostno indikativno **metodo za vrednotenje lipofilnih vitaminov** A, D₃, E in K₁:
 - Izbrali smo kolono **Gemini C18**, 100 × 4,6 mm, 3 μm, mobilno fazo **ACN/MeOH 70 : 30** in valovno dolžino detekcije **280 nm**.
 - Metodo smo za stabilnostno študijo vitamina A še **prilagodili** zaradi nekoliko slabše ločitve razpadnih produktov vitamina A od osnovnega vitamina pri izpostavljenosti zelo stresnim pogojem dlje časa.
 - Z **validacijo** smo potrdili primernost razvite analizne metode, saj so bili vsi validacijski parametri znotraj postavljenih meja sprejemljivosti.
- V stabilnostni študiji smo najprej **preučevali dejavnike**, ki vplivajo na **stabilnost posameznih vitaminov** in ugotovili:
 - V **metanolu** so bili vsi vitamini **zelo stabilni**, najmanj stabilni so bili v destilirani ali navadni vodi.
 - **Nadaljnje študije** stabilnosti smo izvajali v **vodi MQ** zaradi najprimernejše kinetike upada koncentracije vitaminov s časom (ustrezno časovno okno) in kontrolirane kakovosti.
 - **Začetna koncentracija vitaminov** je **vplivala** na stabilnost vseh štirih vitaminov: večja začetna koncentracija – boljša stabilnost.
 - Pri **višji temperaturi (40 °C)** je bila **stabilnost** vseh vitaminov **manjša** – najmanjša pri vitaminu A. Izstopal je vitamin K₁, ki je bil pri vseh temperaturah dokaj stabilen. Za vitamine velja tudi Arrheniusova enačba.
 - **Na svetlobi** so bili vsi vitamini **manj obstojni**, vrstni red po padajoči nestabilnosti zaradi vpliva svetlobe je naslednji: K₁ > D₃ > E > A.
 - **Vodikov peroksid** je imel **nepričakovan vpliv** na stabilnost vitaminov – stabilnost vseh vitaminov je bila v raztopinah vodikovega peroksida boljša kot v vodi MQ.
- Raztopinam posameznih vitaminov smo **dodali dva antioksidanta** in ugotovili:
 - Dodatek **askorbinske kisline** je vitamine stabiliziral le v **manjši meri**.
 - Dodatek **EDTA** je vitamine **izrazito stabiliziral**, stabilizacija je bila manj uspešna le pri vitaminu A.

- Dodatek kombinacije **EDTA in askorbinske kisline** ima **podoben** oz. včasih celo **manjši** vpliv na stabilnost, kot sam dodatek EDTA.
- V raztopinah različnih kombinacij vitaminov smo opazovali njihove medsebojne interakcije in preizkušali različna topila, ki vplivajo na stabilnost:
 - V vodi MQ prihaja do **medsebojne stabilizacije** vitaminov, večinoma so najbolj stabilni v prisotnosti vseh štirih ali vsaj treh vitaminov; kombinacije nekoliko manj stabilizirajo vitamina E in K₁.
 - V navadni vodi je bil **trend stabilizacije podoben** kot v vodi MQ, vse kombinacije pa so bile stabilnejše v vodi MQ.
 - V metanolu so bili vitamini **najstabilnejši** – v kombinacijah se je stabilnost vitaminov še povečala v primerjavi s posameznimi vitamini.
 - Pri preučevanju vpliva **koncentracije vitamina E** na stabilnost drugih vitaminov smo ugotovili:
 - * Vitamin E je **stabiliziral** preostale vitamine – najboljšo stabilnost je dosegel z najmanjšo koncentracijo, razen pri vitaminu K₁, kjer se je z večanjem koncentracije vitamina E večala stabilnost vitamina K₁.
 - * Večja kot je bila koncentracija vitamina E, boljša je bila njegova stabilnost.
 - Spreminjali smo **koncentracije vitamina K₁** in opazovali njegov vpliv na vitamin E:
 - * Vitamin K₁ je **destabiliziral** vitamin E – destabilizacija je bila največja pri največji koncentraciji vitamina K₁.
- Pri testiranju kombinacij vitaminov ob dodatku **antioksidanta EDTA** smo ugotovili:
 - Kombinacije so bile z dodatkom EDTA še **stabilnejše** kot brez dodane EDTA – največja razlika je bila opazna pri vitaminu E.

7. LITERATURA

1. X. Xiuping, Y. Jinming, H. Pingli, Simultaneous Determination of Five Fat-Soluble Vitamins in Feed by High-Performance Liquid Chromatography Following Solid-Phase Extraction, *J Chromatogr Sci* 2008; 46: 345-350.
2. P. Moreno, V. Salvado, Determination of Eight Water- and Fat-soluble Vitamins in Multi-vitamin Pharmaceutical Formulations by High-performance Liquid Chromatography, *J Chromatogr A* 2000; 870: 207-215.
3. M. Heer, J. Titze, S. C. Smith in sod., *Nutrition Physiology and Metabolism in Spaceflight and Analog Studies*, Springer International Publishing, Cham Heidelberg New York Dordrecht London 2015; 27: 37-38.
4. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids, National Academy of Science Press, Washington D. C. 2000; 95.
5. A. Bendich, L. J. Machlin, O. Scandurra in sod., The antioxidant role of vitamin C, *Adv Free Radic Biol Med* 1986; 2: 419-444.
6. J. M. Mata-Granados, M. D. Luque de Castro, J. M. Quesada, Fully Automated Method for the Determination of 24,25(OH)₂ and 25(OH) D₃ Hydroxyvitamins, and Vitamins A and E in Human Serum by HPLC, *J Pharm Biomed Anal* 2004; 35: 575-582.
7. R. B. Rucker, J. W. Suttie, D. B. McCormick in sod., *Handbook of Vitamins*, 3rd edition, Marcel Dekker, New York 2001; 31-33.
8. V. A. Hustead, G. R. Gutcher, S. A. Anderson in sod., Relationship of Vitamin A (retinol) Status to Lung Disease in the Preterm Infant, *J Pediatr* 1984;105:610-615.
9. R. R. Eitenmiller, L. Ye, W. O. Landen Jr., *Vitamin Analysis for the Health and Food Science*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton 2008; 3-7, 83-85, 119-124, 193-196.
10. R. Kawaguchi, J. Yu, J. Honda, J. Hu in sod., A Membrane Receptor for Retinol Binding Protein Mediates Cellular Uptake of Vitamin, *Science* 2007; 315: 820-825.
11. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc, National Academy of Sciences Press, Washington D. C. 2002; 84-85, 95, 125-126.
12. L. Packer, J. Fuchs, *Vitamin E in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York 1993; iii, 450.
13. D. Kritchevsky, Antioxidant Vitamins in the Prevention of Cardiovascular Disease, *Nutr Today* 1992; 27: 30-33.
14. D. J. Rader., H. B. Brewer, Abetalipoproteinemia - New Insights Into Lipoprotein Assembly and Vitamin E Metabolism From a Rare Genetic Disease, *J Am Med Assoc* 1993; 207: 865-869.
15. K. Ouachi, M. Arita, H. Kayden in sod., Ataxia with Isolated Vitamin E Deficiency is Caused by Mutations in the α -Tocopherol Transfer Protein, *Nat Genet* 1995; 9: 141-145.
16. R. S. Gibson, *Principles of Nutrition Assessment*, 2nd edition, Oxford University Press, New York 2005; 510.
17. A. S. Dusso, A. J. Brown, E. Slatopolsky, Vitamin D, *Am J Physiol* 2005; 289: F8-F28.
18. G. Wolf, The Discovery of Vitamin D: the Contribution of Adolf Windaus, *J Nutr* 2004; 134: 1299-1302.
19. E. F. Eriksen, H. Glerup, Vitamin D Deficiency and Aging: Implications for General Health and Osteoporosis, *Biogerontology* 2002; 3: 73-77.
20. M. A. Johnson, M. G. Kimlin, Vitamin D, Aging, and the 2005 Dietary Guidelines for Americans, *Nutr Rev* 2006; 64: 410-421.
21. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorous, Magnesium, Vitamin D and Fluoride, National Academy of Science Press, Washington D. C. 1997; 279-280.

22. N. C. Binkley, D. C. Krueger, T. N. Kawahara in sod., A High Phylloquinone Intake is Required to Achieve Maximal Osteocalcin gamma-Carboxylation, *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 1055–1060.
23. A. Zitterman, Effects of Vitamin K on Calcium and Bone Metabolism, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001; 4: 483-487.
24. D. W. Stafford, The Vitamin K Cycle, *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1873–1878.
25. K. L. Berkner, The Vitamin K-dependent Carboxylase, *Annu Rev Nutr* 2005; 25: 127-149.
26. K. D. Cashman, Vitamin K Status May Be an Important Determinant of Childhood Bone Health, *Nutr Rev* 2005; 63: 284-293 .
27. P. L. Munson, R. A. Mueller, G. R. Breese, Principles of Pharmacology, Fat-soluble Vitamins (R. E. Olson, P. L. Munson), Chapman & Hall, New York 1994; pogl. 58.
28. S. Clark, L. D. Youngman, B. Chukwurah in sod., Effect of Temperature and Light on the Stability of Fat-soluble Vitamins in Whole Blood over Several Days: Implications for Epidemiological Studies, *Int J Epidemiol* 2004; 33: 518–525.
29. K. Yoshida, T. Sekine, F. Matsuzaki in sod., Stability of vitamin A in Oil-In-Water-In-Oil-Type Multiple Emulsions, *J Am Oil Chem Soc* 1999; 76: 1-6.
30. S. R. Park, Y. H. Kim, H. J. Park in sod., Stability of Tocopherols and Tocotrienols Extracted from Unsaponifiable Fraction of Rice Bran under Various Temperature and Oxygen Condition, Poster at 4th International Crop Science Congress, 2004.
31. P.P Nhan, N. K. Hoa, Effect of Light and Storage Time on Vitamin E in Pharmaceutical Products, *B J Pharmacol Toxicol* 2013; 4: 176-180.
32. T. Jafari, G. Askari, N. Mirlohi in sod., Stability of Vitamin D3 in Fortified Yoghurt and Yoghurt Drink (Doogh), *Adv Biomed Res* 2016; 5: 52-57.
33. D. Gutzeit, G. Baleanu, P. Winterhalter in sod., Determination of Processing Effects and of Storage Stability on Vitamin K1 (Phylloquinone) in Sea Buckthorn Berries (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) and Related Products, *J Food Sci* 2007; 72: 491–497.
34. C. L. Wagner, F. R. Greer and the Section on Breastfeeding and Committee on Nutrition, Prevention of Rickets and Vitamin D Deficiency in Infants, Children, and Adolescents, *Am Acad Pediatr* 2008; 122: 1142-1152.
35. S. H. S. Pearce, T. D. Cheetham, Diagnosis and Management of Vitamin D Deficiency, *Br Med J* 2010; 340: 142-147.
36. Medias International d.o.o., Povzetek glavnih značilnosti zdravila Vitalipid N Infant, 11. 6. 2010.
37. Medias International d.o.o., Povzetek glavnih značilnosti zdravila Vitalipid N Adult, 11. 6. 2010.
38. KRKA, tovarna zdravil, d. d., Povzetek glavnih značilnosti zdravila Pikovit, obložene tablete, 23. 6. 2015.
39. KRKA, tovarna zdravil, d. d., Povzetek glavnih značilnosti zdravila Pikovit forte, obložene tablete, 23. 6. 2015.
40. KRKA, tovarna zdravil, d. d., Povzetek glavnih značilnosti zdravila Makrovit, obložene tablete, 23. 6. 2015.
41. Bayer d. o. o., Povzetek glavnih značilnosti zdravila Elevit Pronatal, filmsko obložene tablete, 20. 2. 2015.
42. Laboratoires THEA, Povzetek glavnih značilnosti zdravila HypoTears, 10 mg/g, gel za oko, 23. 5. 2012.
43. KRKA, tovarna zdravil, d. d., Povzetek glavnih značilnosti zdravila AD3, 6000 i.e./2000 i.e. v 1 ml, peroralne kapljice, emulzija, 7. 10. 2011.
44. PLIVA LJUBLJANA, d.o.o., Povzetek glavnih značilnosti zdravila Plivit® D3, 4000 i.e./ml, peroralne kapljice, raztopina, 15. 4. 2011.
45. Actavis Group PTC ehf., Povzetek glavnih značilnosti zdravila Actonel Combi, 35 mg + 1.000 mg/880 i.e., filmsko obložene tablete + šumeča zrnca, 30. 5. 2015.
46. Lek, farmacevtska družba, d.d., Povzetek glavnih značilnosti zdravila Forosa Combo, 70 mg in 1000 mg/880 i.e., filmsko obložene tablete in šumeče tablete, 14. 4. 2015.
47. Lek, farmacevtska družba, d.d., Povzetek glavnih značilnosti zdravila Kalcij/vitamin D3 Lek, 1000 mg/880 i.e., žvečljive tablete, 16. 4. 2015.

48. MEDA AB, Povzetek glavnih značilnosti zdravila Kalcipos, 500mg/800 i.e., žvečljive tablete, 18. 9. 2013.
49. Roche, farmacevtska družba, d.o.o., Povzetek glavnih značilnosti zdravila Konakion, 10 mg/1 ml, raztopina za injiciranje ali peroralna raztopina, 11.12.2009.
50. Council of Europe (COE), European Directorate for the Quality of Medicines, European Pharmacopoeia, 5th Edition, 2004; 1272-1273, 2241-2242, 2282-2284, 2590-2592.
51. Council of Experts and its Expert Committees, The United States Pharmacopeia (Volume 1), United Book Press, Baltimore 2012; 1468-1482.
52. J. O. De Beer, P. Baten, C. Nsengyumva in sod., Measurement Uncertainty from Validation and Duplicate Analysis Results in HPLC Analysis of Multivitamin Preparations and Nutrients with Different Galenic Forms, *J Pharm Biomed Anal* 2003; 32: 767-811.
53. D. Siluk, R. V. Oliveira, M. Esther-Rodriguez-Rosa in sod., A Validated Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Vitamins A and E in Human Plasma, *J Pharm Biomed Anal* 2007; 44: 1001-1007.
54. S. Scalia, A. Renda, G. Ruberto in sod., Assay of Vitamin A Palmitate and Vitamin E Acetate in Cosmetic Creams and Lotions by Supercritical Fluid Extraction and HPLC *J Pharm Biomed Anal* 1995; 13: 273-277.
55. H. Qiana, M. Sheng, Simultaneous Determination of Fat-soluble Vitamins A, D and E and Pro-Vitamin D2 in Animal Feeds by One-step Extraction and High-performance Liquid Chromatography analysis, *J Chromatogr A* 1998; 825: 127-133.
56. T. Guaratini, M. D. Gianeti, P. M. B. G. M. Campos, Stability of Cosmetic Formulations Containing Esters of Vitamins E and A: Chemical and Physical Aspects, *Int J Pharm* 2006; 327: 12-16.
57. P. K. Chatzimichalakis, V. F. Samanidou, I. N. Papadoyannis, Development of a Validated Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Eight Fat-soluble Vitamins in Biological Fluids after Solid-phase Extraction, *J Chromatogr B* 2004; 805: 289-296.
58. International Conference on Harmonization Guidelines, Validation of analytical procedures Q2(R1), Proceeding of the International Conference of Harmonization (ICH), Commission of the European Communities 2005.
59. L. T. Grady, K. D. Thakker, Stability of Solid Drugs: Degradation of Ergocalciferol (vitamin D2) and Cholecalciferol (vitamin D3) at High Humidities and Elevated Temperatures, *J Pharm Sci* 1980; 69: 1099-1102.
60. Žane Temova, Vrednotenje stabilnosti vitamina D3 v raztopinah, prehranskih dopolnilih in zdravilih z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti, magistrska naloga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2015.
61. Merck Millipore, Milli-Q® - Type 1 Ultrapure Water Solutions: Milli-Q® Integral Water Purification System, http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Milli-Q-Integral-Water-Purification-System,MM_NF-C72876, dostop: 6.8.2016.