

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATARINA REDE

**RAZVOJ ANALIZNE METODE NA OSNOVI TEKOČINSKE
KROMATOGRAFIJE VISOKE LOČLJIVOSTI ZA SOČASNO VREDNOTENJE
VSEBNOSTI VITAMINOV B KOMPLEKSA V ZDRAVILIH IN PREHRANSKIH
DOPOLNILIH**

**DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD FOR SIMULTANEOUS
EVALUATION OF B-COMPLEX VITAMINS IN MEDICINAL PREPARATIONS
AND NUTRITION SUPPLEMENTS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

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

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Robertu Roškarju za strokovno usmerjanje, nasvete in izjemno spodbudo. Hvala tudi mladi raziskovalki Žane Temovi Rakuša za pomoč pri praktičnem delu. Za vzpodbudo in podporo pri študiju se zahvaljujem svoji družini in prijateljem.

Izjava

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

Katarina Rede

Predsednik komisije:

prof. dr. dr. h. c. Stanko Srčič, mag. farm.

Član komisije:

izr. prof. dr. Žiga Jakopin, mag. farm.

Ljubljana, 2017

VSEBINA

VSEBINA	i
POVZETEK	iii
ABSTRACT	iv
SEZNAM OKRAJŠAV	v
1 UVOD	1
1.1 VITAMINI B KOMPLEKSA	1
1.1.1 VITAMIN B1 (tiamin)	2
1.1.2 VITAMIN B2 (riboflavin)	2
1.1.3 VITAMIN B3 (nikotinamid)	3
1.1.4 VITAMIN B5 (dekspantenol)	3
1.1.5 VITAMIN B6 (piridoksin)	4
1.1.6 VITAMIN B7 (biotin)	4
1.1.7 VITAMIN B9 (folna kislina)	5
1.1.8 VITAMIN B12 (cianokobalamin)	5
1.2 ZDRAVILA IN PREHRANSKA DOPOLNILA Z VITAMINI B KOMPLEKSA	6
1.3 ANALITIKA VITAMINOV B KOMPLEKSA	10
2 NAMEN DELA	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIALI	14
3.1.1 PRIPRAVKI Z VITAMINI B KOMPLEKSA	14
3.1.2 REFERENČNE SPOJINE	14
3.1.3 REAGENTI IN TOPILA	14
3.1.4 NAPRAVE IN PRIBOR	15
3.2 INSTRUMENTALNA ANALIZNA METODA	15
3.2.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA ANALIZNE METODE	15
3.2.2 KONČNI KROMATOGRAFSKI POGOJI	17
3.3 PRIPRAVA VZORCEV	18
3.3.1 TOPILA	18
3.3.2 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA ANALIZNE METODE	19
3.3.3 VREDNOTENJE METODE HPLC	23
3.3.4 ANALIZA REALNIH VZORCEV	25
3.4 VREDNOTENJE METODE HPLC	27
3.4.1 SELEKTIVNOST	27
3.4.2 LINEARNOST	27
3.4.3 TOČNOST IN PONOVLJIVOST	27

3.4.4	MEJA ZAZNAVE IN MEJA DOLOČITVE	28
3.4.5	STABILNOST VZORCEV	28
3.5	ANALIZA REALNIH VZORCEV	28
3.5.1	OPTIMIZACIJA DETEKCIJE	28
3.5.2	VREDNOTENJE PONOVLJIVOSTI PRIPRAVE VZORCA	28
3.5.3	VREDNOTENJE IZKORISTKA EKSTRAKCIJE	28
3.5.4	IZRAČUN VSEBNOSTI	29
3.6	OBDELAVA PODATKOV	29
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	30
4.1	RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA ANALIZNE METODE	30
4.1.1	KROMATOGRAFIJA	30
4.1.2	PRIPRAVA VZORCEV	35
4.2	VREDNOTENJE METODE HPLC.....	41
4.2.1	SELEKTIVNOST	41
4.2.2	LINEARNOST	43
4.2.3	TOČNOST IN PONOVLJIVOST	45
4.2.4	MEJA ZAZNAVE IN MEJA DOLOČITVE	46
4.2.5	STABILNOST VZORCEV	46
4.3	ANALIZA REALNIH VZORCEV	47
4.3.1	KARAKTERISTIKE REALNIH VZORCEV	47
4.3.2	OPTIMIZACIJA METODE PRIPRAVE VZORCA	48
4.3.3	PREVERJANJE METODE NA REALNIH VZORCIH.....	49
4.3.4	VREDNOTENJE VSEBNOSTI.....	50
4.3.5	KEMIJSKE OBLIKE VITAMINOV	53
4.3.6	ZDRAVILA IN PREHRANSKA DOPOLNILA	53
5	SKLEP.....	55
6	LITERATURA.....	57

POVZETEK

Vitamini so skupina organskih spojin, ki je bistvenega pomena za rast, vzdrževanje in delovanje zdravega organizma. V primeru nezadostnega vnosa s hrano jih lahko dodajamo z multivitaminskimi pripravki v obliki zdravil ali prehranskih dopolnil. Vitamini B kompleksa vključujejo osem vodotopnih vitaminov: tiamin (B1), riboflavin (B2), nikotinamid (B3), deksipantenol (B5), piridoksin (B6), biotin (B7), folno kislino (B9) in cianokobalamin (B12), ki se v multivitaminskih pripravkih največkrat nahajajo združeno. V literaturi opisane analizne metode za vrednotenje vsebnosti vitaminov B kompleksa v pripravkih so dolgotrajne in zapletene ter pogosto namenjene samo izbranim vitaminom.

Namen magistrske naloge je bil razviti enostavno analizno metodo na osnovi tekočinske kromatografije visoke ločljivosti, ki bi omogočala sočasno vrednotenje vseh osmih vitaminov B kompleksa v zdravilih in prehranskih dopolnilih. S prilagajanjem kromatografskih pogojev smo dosegli ustrezno ločljivost vseh analitov v času analize 18 minut. Hkrati smo z razvojem instrumentalne metode razvili tudi postopek priprave vzorcev trdnih farmacevtskih oblik. Tablete smo raztapljali v več različnih topilih in za medij izbrali 100 mM fosfatni pufer s pH 7, ker je pripomogel tudi k stabilnosti raztopine realnega vzorca. Razvito in optimizirano metodo smo validirali v skladu s smernicami ICH za vrednotenje analiznih metod.

Ovrednoteno metodo smo uporabili za ugotavljanje vsebnosti vitaminov B kompleksa v treh zdravilih in petih prehranskih dopolnilih. Na vzorcih različnih pripravkov smo optimizirali postopek priprave vzorcev in metodo dodatno ovrednotili. Tako smo potrdili ustreznost metode za vrednotenje vsebnosti vitaminov B kompleksa v izbranih pripravkih. Rezultati vrednotenja vsebnosti v večini ustrezajo farmakopejskim kriterijem vsebnosti. Na podlagi meritev vitamina B5 smo sklepali, da je na ovojnini testiranih pripravkov morda navedena druga kemijska oblika vitamina, kot je v tabletah, oziroma obratno, da pripravki vsebujejo drugo obliko, kot je navedena na ovojninah. V nobenem testiranem pripravku pa zaradi prenizkih količin nismo zaznali biotina in cianokobalamina. Ugotovili smo, da med zdravili in prehranskimi dopolnili ni večjih razlik v vsebnosti vitaminov.

Ključne besede: vitamini B kompleksa, HPLC, razvoj metode, vrednotenje vsebnosti

ABSTRACT

Vitamins are a group of organic compounds that is essential for the growth, maintenance and development of a healthy organism. In case of insufficient food intake, they can be supplemented with multivitamin preparations in the form of medicinal preparations or nutrition supplements. B-complex vitamins include eight water-soluble vitamins: thiamine (B1), riboflavin (B2), nicotinamide (B3), dexpantenol (B5), pyridoxine (B6), biotin (B7), folic acid (B9) and cyanocobalamin (B12) that are most commonly found together in multivitamin preparations. Analytical methods for evaluation of B-complex vitamins in preparations described in the literature are lengthy and complicated and often intended only for selected vitamins.

The purpose of this Master's thesis was to develop an analytical method based on high performance liquid chromatography, which would enable simultaneous evaluation of all eight B-complex vitamins in medicinal preparations and nutrition supplements. By adapting the chromatographic conditions, an adequate resolution of all analytes was achieved in the time of analysis 18 minutes. Along with developing instrumental method, the process of sample preparation for solid dosage forms was developed. Tablets were dissolved in several different solvents and 100 mM phosphate buffer at pH 7 was selected as medium, since it also contributed to the stability of the real sample solution. Developed and optimized method was validated in accordance with ICH Guidelines for validation of analytical procedures.

The validated method was used to determine the content of B-complex vitamins in three medicinal preparations and five nutrition supplements. Using samples of different preparations, the process of sample preparation was optimized and the method was additionally evaluated. Thus, the adequacy of the method for evaluation of B-complex vitamins in preparations was confirmed. In most cases, the results of the evaluation meet the pharmacopoeial criteria for the assay. Based on the measurements of vitamin B5, we deduced that the packaging of the tested preparations may indicate different chemical form of the vitamin as in the tablets or vice versa that the preparations contain different form as indicated on the packaging. In either of the tested preparations, however, biotin and cyanocobalamin were not detected due to the too low quantities. No major differences in vitamin assay were found between medicinal preparations and nutrition supplements.

Keywords: B-complex vitamins, HPLC, method development, evaluation

SEZNAM OKRAJŠAV

σ – standardni odklon

Φ – pretok

ACN – acetonitril

B1 – tiamin

B2 – riboflavin

B2 fosfat – riboflavin fosfat

B3 – nikotinamid

B5 – dekspantenol

B6 – piridoksin

B7 – biotin

B9 – folna kislina

B12 – cianokobalamin

BHT – butilhidroksitoluen

C – askorbinska kislina

CK – citronska kislina

EDTA – etilendiamintetraocetna kislina

FO – farmacevtska oblika

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

ICH – Mednarodna konferenca o harmonizaciji

konc. – koncentracija

LOD – meja zaznave

LOQ – meja določitve

M – molekulska masa

MeOH – metanol

MS – masni spektrometer

QC – kontrolna raztopina

R^2 – determinacijski koeficient

RDA – odstotek priporočenih vrednosti

RSD – relativni standardni odklon

tbl – tableta

THF – tetrahidrofolat

t_r – retencijski čas

USP – ameriška farmakopeja

V_{inj} – volumen injiciranja

vit. – vitamin

1 UVOD

Vitamini so skupina biološko aktivnih organskih spojin, ki jih človeško telo nujno potrebuje za normalno delovanje fizioloških procesov [1]. Pomembno vlogo imajo pri rasti, vzdrževanju in delovanju zdravega organizma [2]. Glavni vir vitaminov je hrana [3], saj jih sesalci praviloma ne moremo endogeno sintetizirati [1]. Za vzdrževanje zdravja so potrebni le v majhnih količinah, vendar je pomanjkanje ali presežek vitaminov lahko vzrok za resna bolezenska stanja [2, 3]. Sodobne prehranjevalne navade pogosto ne zagotavljajo zadostne količine vitaminov, zato je v razvitih družbah pomanjkanje vitaminov pogost pojav [1]. V primeru nezadostnega vnosa s hrano ali povečanih potreb organizma (nosečnost, stres, povečana fizična aktivnost itn.) je potrebno vitamine dodajati k prehrani v obliki multivitaminskih pripravkov in/ali obogatenih živil [4, 5].

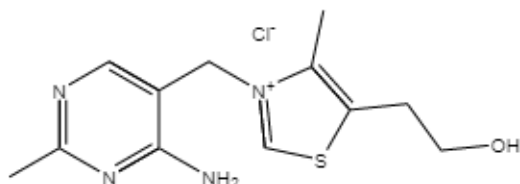
Skupina vitaminov obsega 13 spojin, ki jih glede na topnost delimo na lipidotopne in vodotopne vitamine [1, 2]. V lipidih topni vitamini so vitamini A, D, E in K. Vodotopni vitamini pa so vitamin C in osem vitaminov B kompleksa [1]. Življenjsko pomemben organski material, ki je sestavina hrane, so odkrili v začetku 20. stoletja in ga poimenovali vitamini (*vita* latinsko pomeni življenje). Strukture teh rastnih faktorjev niso poznali, zato so jih označili s črkami glede na vrstni red odkritij. Ko so ugotovili, da je originalni rastni faktor v resnici zmes več spojin, so črkam dodali števila. Danes se oznake uporabljajo kot referenca za fiziološko aktivnost vitamina, medtem ko je trivialno ime namenjeno za specifično spojino, ki ima takšno aktivnost [6].

1.1 VITAMINI B KOMPLEKSA

Vitamini B kompleksa so tiamin (B1), riboflavin (B2), nikotinamid (B3), deksipantenol (B5), piridoksin (B6), biotin (B7), folna kislina (B9) in cianokobalamin (B12). Strukturno gre za zelo različne spojine, ki pa so medsebojno povezane preko vodotopnosti in funkcij, ki jih opravljajo v celicah [1]. Presnovki vitaminov B kompleksa delujejo kot koencimi, redkeje kot substrati, mnogih encimskih reakcij celičnega metabolizma [1, 7]. Ključno vlogo imajo pri katabolnih in anabolnih procesih. Vitamini B1, B2, B3 in B5 sodelujejo pri celičnem dihanju kot neposredni deli citratnega ciklusa in dihalne verige. Vitamin B5 je tudi del substrata (acetil koencim A) za nastanek molekule ATP. Vitamina B1 in B7 imata pomembno vlogo pri presnovi glukoze, vitamin B12 pa pri presnovi maščobnih kislin in aminokislin. Vitamini B2, B6, B9 in B12 omogočajo biosintezo aminokislin ter maščobnih in nukleinskih kislin [1]. Bolezni, ki so posledica nezadostnega vnosa ali prevzema

vitaminov, imajo izvor v spremembah biokemijskih procesov, ki le-te vitamine vključujejo [6]. Pogosto prihaja do pomanjkanja več vitaminov B kompleksa hkrati, zato je potrebno dodajati celoten kompleks tudi, kadar primanjkuje le enega izmed njih. V organizmu se ne kopičijo, ampak se hitro izločijo preko ledvic, zaradi česar je pomembno redno uživanje hrane, bogate z vitamini B kompleksa [8].

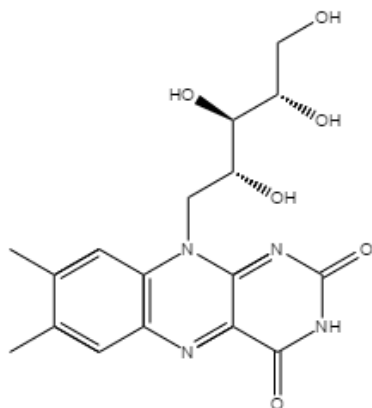
1.1.1 VITAMIN B1 (tiamin)



Slika 1: Struktura vitamina B1

Tiamin (slika 1), tudi anevrin, katalizira dekarboksilacijo α -ketokislin in je tako nujen za metabolizem ogljikovih hidratov. Pomembno vlogo ima tudi v centralnem živčnem sistemu [7]. Pomanjkanje vitamina B1 lahko vodi v poškodbe perifernega živčevja in nepravilnosti v delovanju srčno-žilnega sistema, kar se kaže kot bolečina, edemi, šibkost okončin, zadihanost in nepravilen srčni utrip. Bolezen se imenuje beriberi. Povečano potrebo po vitaminu B1 imajo alkoholiki in tisti, ki zaužijejo večje količine ogljikovih hidratov. Najdemo ga v polnozrnatih žitaricah, rjavem rižu, zeleni zelenjavi, krompirju, jetrih in svinjini [1].

1.1.2 VITAMIN B2 (riboflavin)

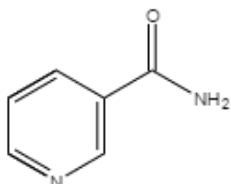


Slika 2: Struktura vitamina B2

Riboflavin (slika 2) ima v strukturi flavinski obroč, ki spojini daje značilno rumeno barvo [9]. V pripravkih se nahaja v čisti obliki ali kot fosfat, ki je bolje topen v vodi [4, 10]. Pomanjkanja vitamina B2 so bila odkrita samo skupaj s pomanjkanjem drugih vitaminov B

kompleksa, še posebno z vitaminoma B1 in B3. Značilen znak nezadostnih količin vitamina B2 so razpokani koticiki ustnic, pogosto pride tudi do vnetja ustne sluznice [6]. Nahaja se v mlečnih izdelkih, jetrih, ledvicah, kvasu in gobah [1]. Riboflavin se v telesu pretvori v flavinadenindinukleotid (FAD) ali flavinadeninmononukleotid (FMN), ki kot kofaktorja sodelujeta pri številnih reakcijah oksidacije in redukcije [7].

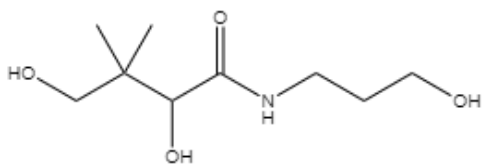
1.1.3 VITAMIN B3 (nikotinamid)



Slika 3: Struktura vitamina B3

Nikotinamid (slika 3) je sestavni del nikotinamidadenindinukleotida (NAD) in nikotinamidadenindinukleotid fosfata (NADP), ki sta koencima številnih dehidrogenaz [1, 8]. Enako biološko aktivnost kot nikotinamid ima tudi nikotinska kislina, saj se slednja v telesu pretvori v amidno obliko. Kemijski obliki vitamina B3 sta med seboj zamenljivi in ju imenujemo tudi niacin [9]. Najdemo ju v mesu, ribah, polnozrnatih žitaricah, stročnicah, gobah in oreščkih [1]. Ima pa vitamin B3, ki za zaužijemo s hrano, nizko biološko razpoložljivost [10]. Pomanjkanje lahko povzroči pelagro, katere značilni sindromi so dermatitis, diareja in demenca [8].

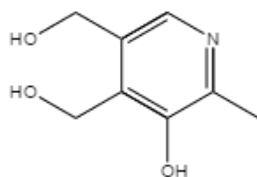
1.1.4 VITAMIN B5 (dekspantenol)



Slika 4: Struktura vitamina B5

Dekspantenol (slika 4) je alkoholna oblika vitamina B5. Ta je lahko tudi v obliki kisline (pantotenska kislina) ali njene soli (pantotenat) [9]. Spojine so dobile ime iz grške besede *panthos*, ki pomeni »je povsod«, saj vitamin B5 najdemo v vseh vrstah živil, še posebno veliko pa ga je v jetrih, ledvicah, jajcih in brokoliu [7, 10]. Do njegovega pomanjkanja pride redko, če že, pa je to običajno v kombinaciji s pomanjkanjem drugih hranil [8]. Je sestavni del acetil koencima A, ki vstopa v citratni cikel in je izhodna spojina za sintezo maščobnih kislin [1].

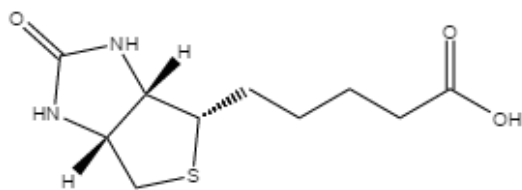
1.1.5 VITAMIN B6 (piridoksin)



Slika 5: Struktura vitamina B6

Piridoksin (slika 5) je le ena izmed mnogih kemijskih oblik vitamina B6 [7]. Njegova aktivna oblika je piridoksal-5-fosfat, ki deluje kot kofaktor predvsem pri metabolizmu aminokislin [6]. Tudi pomanjkanja vitamina B6 so redko opažena in ponavadi povezana s pomanjkanjem drugih vitaminov B kompleksa. Znaki pomanjkanja so dermatitis, vnetje jezika, periferna nevropatija in lahko tudi anemija [8]. Vir vitamina B6 so vse vrste živil. Najdemo ga v mesu, ribah, sadju, zelenjavi in žitih [7].

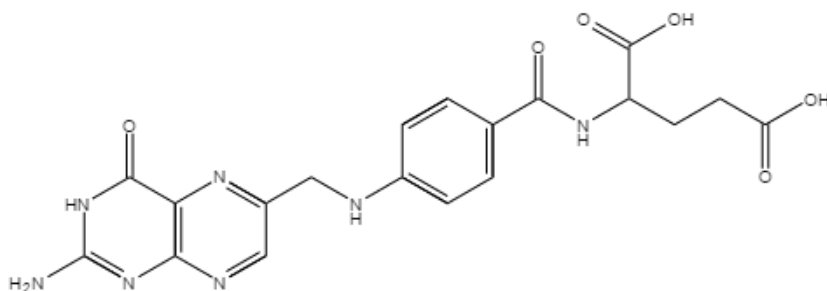
1.1.6 VITAMIN B7 (biotin)



Slika 6: Struktura vitamina B7

Biotin (slika 6) se v naravi nahaja samo v eni obliki, ki je tudi biološko aktivna [9]. V telesu sodeluje pri metabolizmu ogljikovih hidratov kot kofaktor štirih karboksilaz [7]. Najdemo ga v jajcih, jetrih, svinjini in listni zelenjavi [1]. Vir vitamina B7 je lahko tudi črevesna flora, ni pa znano v kolikšni meri [6]. Pomanjkanja tega vitamina so pri ljudeh redka. Do njih pride pri zaužitju večjih količin surovega jajčnega beljaka, ki vsebuje veliko avidina (proteina, ki veže biotin), in pri sindromu kratkega črevesja. Simptomi pomanjkanja so obolenja sluznic in kože, anoreksija, slabost, depresija ter izpadanje las [9].

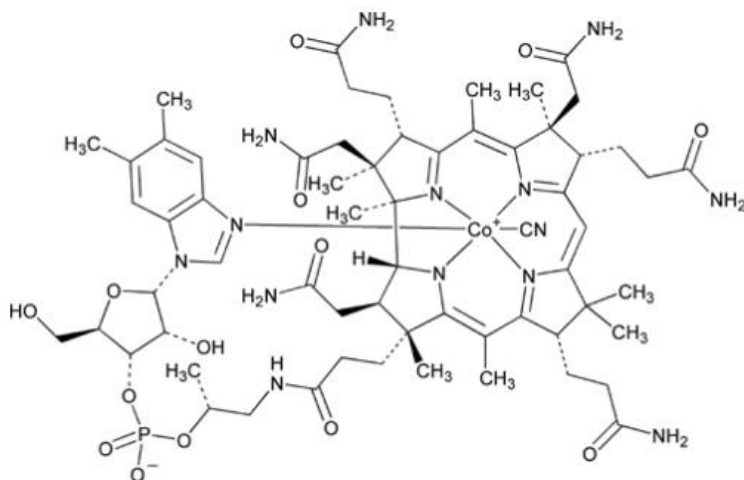
1.1.7 VITAMIN B9 (folna kislina)



Slika 7: Struktura vitamina B9

Folna kislina (slika 7), imenovana tudi pteroilglutaminska kislina, je sestavljena iz pteroiniske in glutaminske kisline. V naravi najdemo vitamin B9 le v obliki folata. Je pa folna kislina bolj pogosta, saj se zaradi večje stabilnosti uporablja v farmacevtskih pripravkih [9]. Fiziološko aktivna oblika je tetrahidrofolat (THF), ki nastane po redukciji folne kisline s pomočjo encima dihidrofolat reduktaza [6]. THF je prenašalec aktiviranih enot ogljikovega atoma in ima pomembno vlogo pri sintezi purinov [7]. Med hipovitaminozami je pomanjkanje vitamina B9 najpogostejše [9]. Lahko je posledica nezadostnega vnosa, pomanjkljive absorpcije, abnormalnega metabolizma ali zdravljenja z zdravili, ki zavirajo dihidrofolat reduktazo (npr. metotreksat) [8, 9]. Pri pomanjkanju lahko pride do megaloblastne anemije, ki pa je ni možno razločiti od tiste, ki jo povzroči pomanjkanje vitamina B12 [7]. Večjo količino vitamina B9 potrebujejo nosečnice, saj je pomanjkanje tega vitamina lahko vzrok za nepravilno zapiranje nevralne cevi pri otroku (spina bifida). Živila, ki so vir vitamina B9, so stročnice, zelenolistna zelenjava in jetra [9].

1.1.8 VITAMIN B12 (cianokobalamin)



Slika 8: Struktura vitamina B12

Cianokobalamin (slika 8) je oblika vitamina B12, ki se v izdelkih najpogosteje uporablja zaradi svoje obstojnosti. Aktivnost vitamina B12 pa imajo tudi drugi kobalamini [4]. Sintetizirajo se izključno v nekaterih mikroorganizmih, vir hranil za človeka pa je hrana živalskega izvora – jetra, morski sadeži, meso, jajca, mleko [7]. Sodeluje pri sintezi nukleinskih kislin in nastajanju rdečih krvnih celic [8]. Pomanjkanje vitamina je pogostejše pri vegetarijancih in lahko povzroči bolezen perniciozno anemijo, ki je vrsta megaloblastne anemije [8, 9].

1.2 ZDRAVILA IN PREHRANSKA DOPOLNILA Z VITAMINI B KOMPLEKSA

Pri vodotopnih vitaminih so hipervitaminoze (presežek vitaminov) redke, mnogo pogostejše se pojavljajo hipovitaminoze (pomanjkanje vitaminov) in avitaminoze (popolno pomanjkanje vitaminov) [10]. Ker gre za življenjsko pomembne snovi, jih moramo, če s hrano ne zaužijemo zadostnih količin, nadomeščati [4, 11]. Najpogosteje se kot dodatek k uravnoteženi prehrani uporabljajo multivitaminski pripravki, ki so na voljo kot zdravila ali prehranska dopolnila.

Zdravilo je vsaka snov ali kombinacija snovi, navadno v ustrezni farmacevtski obliki, ki je predstavljena za zdravljenje, preprečevanje ali diagnosticiranje bolezni pri ljudeh ali živalih oziroma namenjena za ponovno vzpostavitev, izboljšanje ali spremembe fizioloških funkcij preko farmakološkega, imunološkega ali presnovnega delovanja [12].

Prehransko dopolnilo je živilo, katerega namen je dopolnjevanje običajne prehrane, koncentriran vir posameznih ali kombiniranih hranil ali drugih snovi s hranilnim ali fiziološkim učinkom, ki je v farmacevtskih oblikah, da se lahko uživa v odmerjenih majhnih količinskih enotah [13].

Zdravila imajo opredeljene terapevtske indikacije, pri katerih je uporaba zdravila priporočljiva. Njihova proizvodnja in prodaja je strogo nadzorovana, da se zagotovijo kakovost, varnost in učinkovitost [12]. Prehranska dopolnila so razvrščena med živila in so namenjena dopolnitvi vnosa hranil. Pri označevanju, predstavljanju in oglaševanju se jim ne sme predpisovati lastnosti preprečevanja ali zdravljenja bolezni [13]. Vitamini v eni ali drugi vrsti pripravka se med seboj ne razlikujejo, razlike so v regulaciji izdelkov. Pri prehranskih dopolnilih je kakovost več ali manj odvisna od pogojev, ki si jih določi

proizvajalec sam, pri zdravilih pa so minimalni pogoji določeni in nadzorovani preko državne in evropske zakonodaje.

Nekaj zdravil z vitamini B kompleksa, ki so trenutno na slovenskem trgu, je predstavljenih v preglednici I. Večina jih je voljo v lekarnah brez recepta, nekatera se lahko kupi tudi v specializiranih prodajalnah. Izmed navedenih je recept potreben samo za zdravilo Folacin [20]. Vitamin B9 je kot zdravilo na voljo posamično (zdravili Folacin in Tifol) in skupaj z ostalimi vitamini B kompleksa. Zdravilo Milgamma vsebuje le vitamina B1 in B6, ostala zdravila pa večje število vitaminov B kompleksa – tudi v kombinaciji z lipidotopnimi vitamini, vitaminom C in minerali. Prehranska dopolnila, ki smo jih pregledali, so zbrana v preglednici II (podatke smo pridobili z ovojnine pripravkov). Ta imajo v veliki večini deklariranih vseh osem vitaminov B kompleksa. Pogosto vsebujejo tudi v lipidih topne vitamine, vitamin C in minerale tako kot zdravila, dodatno pa lahko vsebujejo še aminokisline, koencim Q10, holin, inozitol, beta glukon, lutein, *para*-aminobenzojsko kislino (PABA), bioflavonoide in izvlečke drog. Najdemo pa med prehranskimi dopolnili tudi pripravke s posamičnimi vitamini B kompleksa (npr. Biotin, Solgar). Prehranska dopolnila so v enakih farmacevtskih oblikah (FO) kot zdravila – tableta, obložena tableta, sirup. Na voljo so tudi v obliki šumečih in žvečljivih tablet, ki jih med zdravili ni. Pripravki imajo prilagojeno sestavo, odmerke in FO glede na ciljno skupino, ki so ji namenjeni. Veliko zdravil in prehranskih dopolnil je namenjeno otrokom (npr. Pikovit, Pikovit forte, Pikovit sirup, Marsovc z inulinom, Marsovc sirup). Ti izdelki imajo poleg nižjih odmerkov vitaminov prilagojeno tudi FO. Na voljo so kot sirupi, žvečljive tablete ali dražeji. Pogosti so tudi pripravki za nosečnice (npr. Elevit Pronatal, Folacin, Tifol, Pronatal multivitamini in minerali Solgar) in starejše (npr. Centrum Silver).

Preglednica I: Zdravila z vitamini B kompleksa, ki so na trgu v Republiki Sloveniji

Ime pripravka, proizvajalec	FO	Sestava	Indikacije
Milgamma 100 mg/100 mg obložene tablete, Wörwag Pharma [14]	obložena tableta	benfotiamin (v maščobah topen derivat vitamina B1), B6	pri boleznih živčevja, ki jih povzroča dokazano pomanjkanje vitaminov B1 in B6
Pikovit obložene tablete, Krka [15]	obložena tableta	vitamini B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12, C, A in D3, kalcij, fosfor	namenjeno predvsem otrokom pri pomanjkanju apetita, preutrujenosti šolskih otrok, kot dodatek po zdravljenju z antibiotiki, kot vitaminsko mineralno dopolnilo k hrani

Pikovit forte obložene tablete, Krka [16]	obložena tableta	vitamini B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12, C, A, D3 in E	pri povečani potrebi po vitaminih in kot dodatek nezadostni ali osiromašeni prehrani pri preutrujenosti in slabi koncentraciji šolskih otrok, telesnih obremenitvah, neredni in enolični prehrani, ki ne vsebuje dovolj svežega sadja in zelenjave, pri pomanjkanju teka, kot dodatek po zdravljenju z antibiotiki
Pikovit sirup, Krka [17]	sirup	vitamini B1, B2, B3, B5, B6, B12, C, A in D3	namenjeno predvsem otrokom pri pomanjkanju apetita, preutrujenosti šolskih otrok, zaostalosti v rasti, kot dodatek po zdravljenju z antibiotiki, kot vitaminsko dopolnilo hrane, posebno v zimskem in spomladanskem času
B-complex obložene tablete, Krka [18]	obložena tableta	vitamini B1, B2, B3, B5, B6 in B12	preprečevanje in zdravljenje hipovitaminoze B in avitaminoze B, povečana poraba vitaminov skupine B, motena absorpcija vitaminov pri boleznih prebavil in jeter, beriberi, nevralgija, polinevritis, nevrodermatoza
Elevit Pronatal filmsko obložene tablete, Bayer [19]	filmsko obložena tableta	vitamini B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, C, A, D3 in E, kalcij, železo, magnezij, mangan, baker, fosfor, cink	preprečevanje ali izboljšanje motenj zaradi porušenega ravnovesja ali pomanjkanja vitaminov ali mineralov med nosečnostjo in dojenjem
Folacin 5 mg tablete, Jadran [20]	tableta	vitamin B9	pomanjkanje folata pri stradanju (parenteralna prehrana), nadomeščanje potreb po folni kislini v času nosečnosti in dojenja, preprečevanje napak nevralne cevi pri novorojenčku, preprečevanje in zdravljenje megaloblastne anemije pri hepatobiliarnih boleznih, pri boleznih tankega črevesa (glutenska enteropatija, steatoreja, sprua), za nadomeščanje potreb po folatih pri vnetnih boleznih črevesja (Crohnova bolezen, ulcerozni kolitis), pri dolgotrajnem zdravljenju z antagonisti folne kisline (metotreksatom ali kombinacijo sulfametoksazola in trimetoprima) ali antikonvulzivi (fenitoin, primidon, fenobarbiton)
Tifol 0,4 mg filmsko obložene tablete,	filmsko obložena	vitamin B9	za preprečevanje pomanjkanja folne kisline pri ženskah, ki načrtujejo

Krka [21]	tableta		zanositev, in nosečnicah, z namenom preprečevanja napak pri zapiranju nevralne cevi novorojenčka (kot npr. spina bifida)
-----------	---------	--	--

Preglednica II: Nekatera prehranska dopolnila z vitamini B kompleksa

Ime pripravka, proizvajalec	FO	Sestava	Uporaba
Supradyn energija, Bayer	šumeče tablete	vitamini B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, C, A, D, E in K, kalcij, magnezij, železo, cink, mangan, baker, jod, selen, molibden, koencim Q10	multivitaminski in multimineralni pripravek, posebej prirejen za odrasle in mladostnike, starejše od 14. let, vsebuje vir fenilalanina
Vitamini B-kompleks z vitaminom C, Terranova	kapsula	vitamini B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12 in C, kalcij, magnezij, holin, inozitol, stabilizirani riževi otrobi, korenina rožnega korena, sibirski ginseng, korenina indijskega ginsenga, seme mladega ovsa, cvet in list lucerne, list peteršilja, list regrata, pesin sok in list, bučno seme	zmanjšujejo utrujenost in izčrpanost, prispevajo k normalnemu psihološkemu in umskemu delovanju, za boljše delovanje živčnega sistema, za delovanje imunskega sistema, ob stresu
Marsovci z inulinom, Walmark	žvečljiva tableta	vitamini B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, C, A, D in E, železo, jod, cink, selen, inulin	kompleks vitaminov in mineralov za otroke, v obliki žvečljivih tablet, vsaka tableta vsebuje vitamine in minerale v splošno priporočenih količinah, primerno za otroke od 4. leta dalje
Marsovci sirup, Walmark	sirup	vitamini B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, C, A, D3 in E, cink, jod, PABA, L-lizin, izvleček šipka, beta glukan, bioflavonoidi	kompleks vitaminov in mineralov, ki so pomembni za fiziološko rast in zdrav razvoj organizma, vsebuje kompleks Imunactiv, je odličnega pomarančnega okusa in primeren za otroke od 1. leta starosti
Centrum Silver 50+, Pfizer	tableta	vitamini B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, C, A, D, E in K, lutein, kalcij, fosfor, magnezij, železo, jod, baker, mangan, krom, molibden, selen, cink	prehransko dopolnilo z vitamini, minerali in luteinom za odrasle, starejše od 50 let
FidiVit B retard,	obložena	vitamini B1, B2, B3, B5,	tablete z vitamini skupine B v

Fidimed	tableta	B6, B7, B9 in B12	obliki tablet retard s podaljšanim sproščanjem, krepki odmerki vitaminov skupine B, za živčevje, umsko zmogljivost in normalno psihološko delovanje
Biotin 300 µg, Solgar	tableta	vitamin B7	vitamin za kožo in lase
Prenatal multivitamini in minerali, Solgar	tableta	vitamini B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, C, A, D in E, kalcij, magnezij, izolat proteina soje, železo, L-asparaginska kislina, glicin, inozitol, holin, baker, mangan, jod, selen, krom	posebno formuliran vitaminsko-mineralni pripravek, ki vsebuje kompleks pomembnih mikrohranil, prvenstveno namenjen nosečnicam in doječim materam, vendar odličen tudi za vse ženske v generativni dobi, količine vitaminov, mineralov in drugih hranil so optimalno uravnotežene z nujno potrebnimi sestavinami za mamo ter tudi za postnatalni razvoj otroka

Direktiva 2002/46/ES o prehranskih dopolnilih določa, da morajo biti količine hranil na ovojnicah navedene za dnevni odmerek proizvoda in kot odstotek priporočenih vrednosti (RDA) [14]. Vrednosti RDA predstavljajo minimalni dnevni vnos posameznega hranila, ki naj bi zadostoval prehranskim potrebam večine zdravega prebivalstva. Optimalne količine vitaminov in mineralov, ki bi jih morali zaužiti v enem dnevu, pa niso znane oziroma so podatki nepopolni [1].

Vsebnost vitaminov v pripravkih je treba preverjati, da se zagotovi vnos pravega odmerka in ugotovi ustreznost deklaracij. Izguba vitaminov je lahko povezana s formulacijo, tehnologijo izdelave in shranjevanjem izdelka [4]. Ameriška farmakopeja (USP) predpisuje količine vodotopnih vitaminov, ki so lahko v pripravku, glede na deklarirane vrednosti. Predpis je odvisen od FO in od prisotnosti mineralov in/ali v lipidih topnih vitaminov v izdelku [22].

1.3 ANALITIKA VITAMINOV B KOMPLEKSA

Vrednotenje vsebnosti vitaminov B kompleksa je problematično zaradi velikih razlik v kemijski strukturi vitaminov B kompleksa, njihove nestabilnosti in kompleksnosti sistema, v katerem se navadno nahajajo [23]. Poleg tega se količine posameznih vitaminov v pripravkih močno razlikujejo – od 30 µg (B7) do 20 mg (B3) [24]. Za kontrolo kakovosti multivitaminskih pripravkov so potrebne ustrezne separacijske tehnike [25]. Vodilno vlogo pri kvantitativnem vrednotenju vitaminov (in drugih analitov) ima tekočinska

kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), sklopljena z različnimi detekcijskimi sistemi [4]. Za vrednotenje vitaminov B kompleksa se poleg metod HPLC uporabljajo še metode kot so kapilarna elektroforeza [25], micelarna tekočinska kromatografija [26] in kromatografija s superkritičnimi fluidi [2].

Običajno lahko s HPLC izokratsko ločimo določene kombinacije dveh ali treh vitaminov, za sočasno vrednotenje zapletenejših zmesi pa je potrebno uporabiti gradientni program izpiranja. Za ločevanje vitaminov B kompleksa se najpogosteje uporabljajo reverznofazne, pa tudi normalnofazne in ionsko-izmenjevalne stacionarne faze [27]. Vitamini se najpogosteje detektirajo z UV detektorji. V uporabi je tudi detekcija z masnim spektrometrom (MS), ki ima v primerjavi z UV večjo občutljivost in specifičnost. Oba načina detekcije se lahko uporabljata tudi v kombinaciji [24]. V ameriški farmakopeji so opisane metode HPLC za ugotavljanje vsebnosti posameznih vitaminov B kompleksa. Za vsak vitamin je potrebno pripraviti ločen vzorec in ga analizirati pri različnih kromatografskih pogojih. Sočasno vrednotenje je opredeljeno le za vitamine B1, B2, B3 in B6 [22]. Tudi večina metod HPLC iz literaturnih virov je namenjena ugotavljanju vsebnosti enega vitamina B kompleksa ali manjšega števila vodotopnih vitaminov [4]. Mnoge metode za vrednotenje multivitaminskih pripravkov zahtevajo zapleteno pripravo vzorcev, kot je ekstrakcija na trdni fazi (SPE) [24]. V preglednici III je zbranih nekaj metod HPLC, ki so bile razvite za vrednotenje vitaminov B kompleksa. V vseh pregledanih metodah je uporabljena reverznofazna kromatografija. Pri metodah št. 2, 3 in 5 se uporablja ionsko parni reagent (heksansulfonat). Mobilno fazo sestavljata vodna faza in organski modifikator, ki je ali acetonitril (ACN) ali metanol (MeOH). Nobena izmed metod ne zajema določanja vseh predstavnikov kompleksa vitaminov B, ampak le izbrane vodotopne vitamine. Metoda št. 5 je razvita samo za analizo raztopine standardov in ne vključuje priprave realnih vzorcev. Ostale metode so namenjene vrednotenju vsebnosti vitaminov B kompleksa v multivitaminskih pripravkih različnih FO.

Preglednica III: Reprezentativne metode HPLC za vrednotenje vitaminov B kompleksa

Št.	Vzorec (FO)	Analiti	Kolona	Mobilna faza, izpiranje	Drugi kromatografski pogoji
1 [27]	pripravek	B1, B2, B3, B6, B12	Nova-Pack C18 (150 × 3,9 mm, 4 μm)	A – 0,05 M NH ₄ CH ₃ COO B – MeOH gradientni program: 0–1,5 min: 7,5 % B 1,6–15 min: 16 % B	Φ: 1 mL/min V _{inj} : 40 μL λ: 270, 362 nm T: sobna

				15 min: 30 % B	
2 [28]	pripravek (draže)	B1, B2, B3, B6, C	Supelcosil LC-8-DB (250 × 4,6 mm, 5 µm)	A – natrijev heksansulfonat in trietanolamin v vodi B – MeOH izokratsko: 85 % A, 15 % B A – natrijev heksansulfonat in trietanolamin v vodi B – MeOH gradientni program: 0–10 min: 8 % B 10 min: 17,2 % B	Φ: 2 mL/min V _{inj} : 10 µL λ: 280 nm T: sobna
3 [5]	pripravek (sirup)	B1, B2 fosfat, B3, B5, B6, C	Zorbax SB-Aq C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm)	A – 0,0125 M natrijev heksan-1-sulfonat v 0,1 % H ₃ PO ₄ B – ACN gradientni program: 0–15 min: 0 % B 15–35 min: 0 do 15 % B 35–40 min: 15 % B 40–55 min: 15 do 30 % B 55–60 min: 30 % B 60–66 min: 30 do 0 % B 66–72 min: 0 % B	Φ: 1 mL/min V _{inj} : 20 µL λ: 210, 254 nm T: sobna
4 [23]	pripravek (tableta)	B1, B6, B12	Hypersil- BDS C18 (100 × 4,6 mm, 3 µm)	A – 0,015 % trietilamin, uravnan na pH 2,7 z 1 N H ₂ SO ₄ B – ACN gradientni program: 0–3 min: 0 % B 3–6 min: 0 do 25 % B 6–10 min: 25 do 0 % B 6–11 min: 0 % B	Φ: 1,5 mL/min V _{inj} : 100 µL λ: 280, 350 nm T: 30 °C
5 [11]	standardi	B1, B2, B3, B6	Hypersil C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm)	A – MeOH B – 0,5 % CH ₃ COOH z 2,5 mM natrijevega heksansulfonata izokratsko: 18 % A, 82 % B	Φ: 1,2 mL/min V _{inj} : 20 µL λ: 280 nm T: 30 °C
6 [24]	pripravek (tableta)	B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9	Hydro-RP C18 (250 × 2,0 mm, 4 µm)	A – 0,1 % HCOOH v vodi B – 0,1 % HCOOH v ACN gradientni program: 0–5 min: 0 % B 5–15 min: 0 do 50 % B 15–17 min: 50 do 95 % B 17,1–25 min: 0 % B	Φ: 0,25 mL/min V _{inj} : 5 µL λ: 260, 270, 280, 292 nm T: 30 °C Metoda sklopljena z MS.

Φ – pretok

V_{inj} – volumen injiciranja

λ – valovna dolžina detekcije

T – temperatura kolone

B2 fosfat – riboflavin fosfat

2 NAMEN DELA

Vitamini B kompleksa obsegajo osem strukturno različnih vitaminov, ki so zaradi prepletenosti funkcij, ki jih opravljajo, združeni v kompleks. Ti vitamini so tiamin (B1), riboflavin (B2), nikotinamid (B3), dekspantenol (B5), piridoksin (B6), biotin (B7), folna kislina (B9) in cianokobalamin (B12). V pripravkih se največkrat nahajajo združeno, pogosto tudi skupaj z minerali in lipidotopnimi vitamini, v t.i. multivitaminskih pripravkih. Ker gre za spojine, ki imajo zelo različne kemijske in fizikalne lastnosti, je ugotavljanje vsebnosti vitaminov B kompleksa oteženo. Do sedaj razvite analizne metode so namenjene samo izbranim vitaminom B kompleksa ali pa so dolgotrajne in zahtevajo zapleten postopek priprave vzorcev.

Primarni namen magistrske naloge bo razvoj analizne metode na osnovi tekočinske kromatografije visoke ločljivosti, ki bo omogočala sočasno vrednotenje vseh osmih vitaminov B kompleksa v zdravilih in prehranskih dopolnilih. Osredotočili se bomo na analizo trdnih farmacevtskih oblik in zanje razvili enostaven postopek priprave realnih vzorcev. Kromatografske pogoje bomo prilagodili tako, da bo metoda HPLC učinkovito ločila vseh osem vitaminov B kompleksa.

Razvito in optimizirano metodo bomo validirali v skladu s smernicami ICH za vrednotenje analiznih metod. Naš referenčni vzorec bo raztopina standardov vitaminov B kompleksa, ki bo vsebovala koncentracije vitaminov v enakem razmerju kot v študijo vključeni pripravki po pripravi vzorca. Raztopini standardov bomo za čas analize zagotovili ustrezno stabilnost.

Z ovrednoteno analizno metodo bomo ugotavljali vsebnost vitaminov B kompleksa v izbranih pripravkih. Dejanske količine vitaminov bomo primerjali z deklariranimi vrednostmi, pri čemer bomo upoštevali kemijsko obliko vitamina, ki je navedena na ovojnini pripravka, saj se nekateri izmed vitaminov B kompleksa lahko nahajajo v več različnih oblikah. V ta namen bomo pregledali ovojnino izbranih pripravkov. Preverili bomo, če dejanske količine vitaminov ustrezajo farmakopejskim kriterijem, in ugotavljali, ali obstajajo razlike med rezultati vrednotenja vsebnosti vitaminov B kompleksa za zdravila in prehranska dopolnila.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 PRIPRAVKI Z VITAMINI B KOMPLEKSA

- pripravek A: Pikovit obložene tablete, Krka
- pripravek B: Pikovit forte obložene tablete, Krka
- pripravek C: Elevit Pronatal filmsko obložene tablete, Bayer
- pripravek D: B kompleks vitamini, Natural Wealth
- pripravek E: Centrum Silver 50+, Pfizer
- pripravek F: Supradyn Vital 50+, Bayer
- pripravek G: Vitamini in minerali, Lekarna Ljubljana
- pripravek H: B Complex 100 timed release, Jamieson

Pripravki od A do C so zdravila, ki se izdajo brez recepta v lekarnah in specializiranih prodajalnah. Pripravki od D do H so prehranska dopolnila.

3.1.2 REFERENČNE SPOJINE

- L-askorbinska kislina, $C_6H_8O_6$, $M = 176,1 \text{ g/mol}$, 99,0 % (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- (-)-riboflavin, $C_{17}H_{20}N_4O_6$, $M = 376,36 \text{ g/mol}$, $\geq 98 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- folna kislina, $C_{19}H_{19}N_7O_6$, $M = 441,40 \text{ g/mol}$, $\geq 97 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- biotin, $C_{10}H_{16}N_2O_3S$, $M = 244,31 \text{ g/mol}$, $\geq 99 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- cianokobalamin, $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$, $M = 1355 \text{ g/mol}$, 99,6 % (Fagron, ZDA)
- nikotinamid, $C_6H_9N_2O$, $M = 122,1 \text{ g/mol}$, $\geq 98 \%$ (Fagron, ZDA)
- piridoksinijev klorid, $C_8H_{12}ClNO_3$, $M = 205,6 \text{ g/mol}$, $\geq 99 \%$ (Fagron, ZDA)
- dekspantenol, $C_9H_{19}NO_4$, $M = 205,25 \text{ g/mol}$, $\geq 98 \%$ (Fagron, ZDA)
- tiaminijev klorid, $C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$, $M = 337,3 \text{ g/mol}$, $\geq 98,5 \%$ (Aca Pharma, Belgija)
- riboflavin natrijev fosfat, $C_{17}H_{20}N_4NaO_9P$, $M = 478,3 \text{ g/mol}$ (Spruyt hillen, Nizozemska)

3.1.3 REAGENTI IN TOPILA

- voda MiliQ, Fakulteta za farmacijo
- acetonitril, C_2H_3N , za HPLC, $\geq 99,9 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- EDTA, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \times 2H_2O$, $M = 372,24 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)

- fosforjeva(V) kislina, H_3PO_4 , $M = 98,00 \text{ g/mol}$, $\geq 85,0 \%$ (Merck, Nemčija)
- citronska kislina, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$, $M = 210,14 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- natrijev hidroksid, NaOH , $M = 40,00 \text{ g/mol}$, za pripravo 1 M raztopine (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- metanol, CH_3OH , za HPLC, $\geq 99,9 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- 2-propanol, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$, za HPLC, $\geq 99,9 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- natrijev hidrogenfosfat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $M = 137,99 \text{ g/mol}$ (Merck, Nemčija)
- butilhidroksitoluen, $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$, $M = 220,35 \text{ g/mol}$, $\geq 99,9 \%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)

3.1.4 NAPRAVE IN PRIBOR

- analitska tehnica Excellence Plus (Mettler Toledo, Švica)
- digitalna tehnica Exacta 300EB (Tehnika, Slovenija)
- avtomatske pipete 2–20 μL , 20–200 μL , 100–1000 μL (Eppendorf, Nemčija)
- centrifuga Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Nemčija)
- filter z velikostjo por 0,45 μm (Sartorius, Nemčija)
- vibracijski mešalnik Vibromix 10 (Tehnika, Slovenija)
- magnetno mešalo Ikamag RO 5 power (Mikro+Polo, Slovenija)
- sistem HPLC Agilent 1100/1200 Series (Agilent Technologies, ZDA):
razplinjevalec, kvarterna črpalka, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, variabilni UV – VIS detektor, programska oprema ChemStation
- kolona Luna C18 (2), $150 \times 4,6 \text{ mm}$, 5 μm (Phenomenex, ZDA)
- predkolona Luna C18 $4 \times 3,0 \text{ mm}$ (Phenomenex, ZDA)
- sistem za pripravo vode MiliQ A10 Advantage (Milipore Corporation, ZDA)
- ultrazvočni kadički Sonic 4 (Iskra Pio, Slovenija) in Sonorex (Bandelin, Nemčija)
- pH meter FiveEasy Plus (Mettler Toledo, Švica)
- steklovina (čaše, merilne bučke, zamaški, čolnički za tehtanje, viala, merilni valji)
- ostalo: spatule, plastične kapalke, epice, nastavki za pipete, magneti za magnetna mešala, Parafilm M[®]

3.2 INSTRUMENTALNA ANALIZNA METODA

3.2.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA ANALIZNE METODE

Pri razvoju in optimizaciji analizne metode smo uporabljali reverznofazno analitsko kolono Luna C18 $150 \times 4,6 \text{ mm}$, 5 μm . Preverjali smo različne gradientne programe in pretoke s

ciljem izboljšanja ločbe kromatografskih vrhov posameznih analitov, optimizacije oblike in širine kromatografskih vrhov ter skrajšanja časa izpiranja. 0,1 % (m/v) H_3PO_4 in ACN v različnih razmerjih in gradientnih programih sta nam služila kot mobilna faza. Metode, ki smo jih preverili med razvojem in optimizacijo analizne metode (priprava vzorcev v poglavju 3.3.2.1), so navedene v preglednici IV.

Preglednica IV: Seznam metod, ki smo jih uporabili med razvojem in optimizacijo analizne metode

Št.	Gradientni program (A – 0,1 % H_3PO_4 , B – ACN)	Pretok [mL/min]	Čas analize [min]
0	0–5 min: 0 % B, 5–15 min: 40 % B, 15,1 min: 0 % B	1	19
1	0–5 min: 0 % B, 5–10 min: 0 do 40 % B, 10–11 min: 40 % B, 11,1 min: 0 % B	1	19
2	0–3 min: 0 % B, 3–10 min: 40 % B, 10,1 min: 0 % B	1,5	18
3	0–5 min: 0 % B, 5–6 min: 35 % B, 6–13 min: 40 % B, 13,1 min: 0 % B	1	18
4	0–5 min: 0 % B, 5–7 min: 30 % B, 7–14 min: 40 % B, 14,1 min: 0 % B	1	18
5	0–5 min: 0 % B, 5–6 min: 25 % B, 6–14 min: 40 % B, 14,1 min: 0 % B	1	18
6	0–5 min: 0 % B, 5–6 min: 0 do 35 % B, 6–16 min: 35 % B, 16,1 min: 0 % B	1	18
7	0–4 min: 0 % B, 4–5 min: 0 do 30 % B, 5–12 min: 30 % B, 12,1 min: 0 % B	1	18
8	0–4 min: 0 % B, 4–5 min: 0 do 25 % B, 5–14 min: 25 % B, 14,1 min: 0 % B	1	18
9	0–4,5 min: 0 % B, 4,5–5 min: 0 do 20 % B, 5–15 min: 20 % B,	1	18

	15,1 min: 0 % B		
10	0–4,5 min: 0 % B, 4,5–5 min: 15 % B, 5–10 min: 15 do 20 % B, 10–15 min: 20 % B, 15,1 min: 0 % B	1	18
11	0–4,5 min: 0 % B, 4,5–5 min: 20 % B, 5–11 min: 30 % B, 11,1 min: 0 % B	1	18
12	0–4,5 min: 0 % B, 4,5–5 min: 15 % B, 5–15 min: 25 % B, 15,1 min: 0 % B	1	18
13	0–4,5 min: 0 % B, 4,5–5 min: 0 do 15 % B, 5–15 min: 15 % B, 15,1 min: 0 % B	1	25
14	0–4,5 min: 0 % B, 4,5–5 min: 0 do 10 % B, 5–20 min: 10 % B, 20,1 min: 0 % B	1	25
15	0–4,5 min: 0 % B, 4,5–5 min: 0 do 12 % B, 5–20 min: 12 % B, 20,1 min: 0 % B	1	22
16	0–4,5 min: 0 % B, 4,5–5 min: 0 do 12 % B, 5–18 min: 12 % B, 18,1 min: 0 % B	1,2	20
17	0–4,5 min: 0 % B, 4,5–5 min: 0 do 13 % B, 5–15 min: 13 % B, 15,1 min: 0 % B	1,2	18
18	0–4,5 min: 0 % B, 4,5–5 min: 0 do 13 % B, 5–20 min: 13 % B, 20,1 min: 0 % B	1	22
19	0–4,5 min: 0 % B, 4,5–5 min: 0 do 13 % B, 5–14 min: 13 % B, 14,1 min: 0 % B	1	18

3.2.2 KONČNI KROMATOGRAFSKI POGOJI

- kolona: Luna C18 150 × 4,6 mm, 5 µm
- mobilna faza: 0,1 % (m/v) H₃PO₄ in ACN

- gradientni program: 0–4,5 min: 0 % B, 4,5–5 min: 0 do 13 % B, 5–14 min: 13 % B, 14,1 min: 0 % B
- pretok mobilne faze: 1 mL/min
- temperatura avtomatskega vzorčevalnika: 25 °C
- volumen injiciranja: 20 µL
- temperatura kolone: 40 °C
- valovna dolžina detekcije: 210 nm in 280 nm
- čas analize: 18 min
- retencijski časi analitov: B1: 1,5 min, B3: 2,4 min, C: 2,7 min, B6: 4,0 min, B5: 8,6 min, B9: 9,2 min, B12: 11,2 min, B2: 13,0 min, B7: 13,5 min

3.3 PRIPRAVA VZORCEV

3.3.1 TOPILA

3.3.1.1 Priprava 0,1 % H_3PO_4

0,1 % H_3PO_4 nam je služila kot vodni del mobilne faze. Pripravili smo jo tako, da smo steklenico za mobilno fazo napolnili z 1 L vode MiliQ in z avtomatsko pipeto dodali 1,176 mL 85 % H_3PO_4 . Raztopino smo za 15 minut postavili v ultrazvočno kadičko, da se je razplinila.

3.3.1.2 Priprava 0,1 mM raztopine EDTA v 0,01 M raztopini NaOH

0,01 M NaOH smo pripravili iz predhodno pripravljene 1 M raztopine NaOH. V 100 mL bučko smo z avtomatsko pipeto odmerili 1 mL 1 M NaOH in dopolnili z vodo MiliQ do oznake. Natehtali smo 3,7 mg etilendiamintetraoetne kisline (EDTA) in spojino kvantitativno prenesli v 100 mL bučko ter jo raztopili v predhodno pripravljeni 0,01 M NaOH, da smo dobili raztopino EDTA s koncentracijo 0,1 mM.

3.3.1.3 Priprava 100 mM fosfatnega pufra s pH 7

Za pripravo 100 mM fosfatnega pufra smo najprej natehtali 27,6 g $NaH_2PO_4 \times H_2O$. Natehtano smo kvantitativno prenesli v 2 L bučko in dodali približno 1 L vode MiliQ. Raztopini smo z 1 M raztopino NaOH umerili pH na 7,0 in dodali vodo MiliQ do oznake. Pripravljenemu pufru smo ponovno izmerili pH in ostal je nespremenjen.

3.3.1.4 Priprava raztopin antioksidantov

Raztopino butilhidroksitoluena (BHT) s koncentracijo 0,01 mg/mL smo pripravili tako, da smo natehtali 1 mg BHT, ga kvantitativno prenesli v bučko in raztopili v 100 mL vode MiliQ. Raztapljanje smo pospešili z uporabo ultrazvoka.

Za pripravo 0,5 mM raztopine EDTA smo natehtali 18,6 mg EDTA, natehtano kvantitativno prenesli v 100 mL bučko in dodali vodo MiliQ do oznake.

1 mM raztopino citronske kisline (CK) pa smo pripravili tako, da smo natehtali 21,0 mg CK, natehtano kvantitativno prenesli v bučko in raztopili v 100 mL vode MiliQ.

3.3.2 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA ANALIZNE METODE

3.3.2.1 Priprava zmesi standardov za razvoj in optimizacijo analizne metode

Za razvoj analizne metode smo najprej pripravili raztopine posameznega vitamina s koncentracijo 1 mg/mL. Po 1 mg standarda vitaminov B1, B2, B3, B5, B6, B12 in riboflavin fosfata smo natehtali v 1 mL epico in ga raztopili v 1 mL vode MiliQ. Odpipetirali smo 100 μ L posamezne raztopine vitamina in alikvote združili v eni viali, da smo dobili zmes standardov z 0,14 mg/mL posameznega vitamina.

3.3.2.2 Priprava raztopin vitamina B7, vitamina B9 in askorbinske kisline

V 1 mL epico smo natehtali po 1 mg standarda vitamina B7, vitamina B9 in askorbinske kisline (vitamin C) ter vsakega raztopili v 1 mL vode MiliQ, da smo dobili raztopine s koncentracijo 1 mg/mL. Za določanje retencijskih časov (t_r) posameznega vitamina smo v vialo odpipetirali 200 μ L posamezne raztopine in dodali 800 μ L vode MiliQ. Za razvoj in optimizacijo analizne metode pa smo 100 μ L posamezne raztopine teh treh vitaminov in 100 μ L posamezne 1 mg/mL raztopine vitaminov, pripravljene po postopku 3.3.2.1, združili v viali in dobili zmes standardov z 0,11 mg/mL posameznega vitamina.

3.3.2.3 Priprava raztopin pripravkov A, B in F za testiranje metode 18

Eno tableto pripravka A smo raztopili v 10 mL 0,1 % H_3PO_4 (3.3.1.1), po eno tableto pripravkov B in F pa v 25 mL 0,1 % H_3PO_4 . Razpad tablet smo pospešili z uporabo vibracijskega mešalnika za 5 min in ultrazvoka za 10 min. Iz vsakega vzorca smo v 2 mL epico odpipetirali 2 mL vzorca in centrifugirali 15 min pri 13.000 obratih na 20 °C. Supernatant smo prefiltrirali preko 0,45 μ m filtra in filtrat prenesli v vialo. Vsakega izmed vzorcev smo tudi dodatno redčili z 0,1 % H_3PO_4 – vzorce pripravka A 10-krat, vzorce

pripravkov B in F pa 4-krat. Tako pripravljene raztopine smo analizirali pri kromatografskih pogojih metode 18.

3.3.2.4 *Priprava koncentriranih raztopin standardov*

Po 1 mg posameznega standarda vitaminov B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12 in C smo natehtali v 1 mL epice in vsakemu dodali 1 mL vode MiliQ, da smo dobili raztopine posameznega standarda s koncentracijo 1 mg/mL.

3.3.2.5 *Priprava raztopin standardov vitaminov B2 in B9 v organskih topilih*

V 5 mL bučke smo natehtali ustrezno količino standardov vitamina B2 in vitamina B9, da smo pripravili njune raztopine v izbranih organskih topilih – MeOH, ACN, MeOH in ACN v razmerju 1:1 ter 2-propanol. V MeOH smo pripravili raztopine vitamina B2 s koncentracijami 2,0, 1,0, 0,50 in 0,25 mg/mL ter raztopini vitamina B9 s koncentracijami 0,50 in 0,25 mg/mL. V ACN, MeOH in ACN v razmerju 1:1 ter 2-propanolu smo pripravili raztopine vitaminov B2 in B9 z 0,50 in 0,25 mg/mL posameznega vitamina. Da smo pospešili raztapljanje, smo vse vzorce za 10 min postavili v ultrazvočno kadičko.

3.3.2.6 *Priprava raztopine standardov vitaminov B2 in B9 v raztopini NaOH z EDTA*

Natehtali smo 4 mg standarda vitamina B2 in 4 mg standarda vitamina B9, natehtano kvantitativno prenesli v 20 mL bučki in ju dopolnili z 0,01 M raztopino NaOH z dodatkom EDTA, pripravljeno po postopku 3.3.1.2. Z avtomatsko pipeto smo odpipetirali 3,5 mL pripravljene raztopine vitamina B2 in 0,7 mL pripravljene raztopine vitamina B9 ter ju prenesli v 10 mL bučko, tako da smo po dodatku topila (raztopina NaOH z EDTA) dobili zmes standardov vitamina B2 s koncentracijo 140 mg/L in vitamina B9 s koncentracijo 28 mg/L.

3.3.2.7 *Priprava raztopine standardov vitaminov B2 in B9 v 0,01 M NaOH in 100 mM fosfatnem pufru s pH 7*

Najprej smo natehtali 7 mg standarda vitamina B2 in 1,4 mg standarda vitamina B9, natehtano kvantitativno prenesli v 50 mL bučko in raztopili v 5 mL 0,01 M raztopine NaOH. Ko sta se standarda popolnoma raztopila, smo do oznake dopolnil s 100 mM fosfatnim pufrom s pH 7, pripravljenim po postopku 3.3.1.3.

3.3.2.8 *Priprava raztopin askorbinske kisline z antioksidanti*

Za namene izbire stabilizatorja vitamina C smo standard vitamina C raztopili v raztopinah treh antioksidantov – raztopini BHT s koncentracijo 0,01 mg/mL, 0,5 mM raztopini EDTA

in 1 mM raztopini CK, ki so bile pripravljene, kot je opisano v poglavju 3.3.1.4. V vsakem izmed treh topil smo pripravili raztopino vitamina C s koncentracijo 150 mg/mL in jo redčili, da smo dobili še raztopine vitamina C s koncentracijami 120, 90, 60, 30, 15, 7,5 in 3,0 mg/mL. Vzorce smo analizirali takoj po pripravi, po 7-ih in 24-ih urah. Odzive, dobljene po 7-ih in 24-ih urah, smo nato primerjali z odzivi ob času 0 in kvocient podali v odstotkih.

3.3.2.9 Priprava raztopin pripravka D v 0,1 % H_3PO_4 , vodi MiliQ in 0,01 M NaOH

Po eno tableto vzorčnega pripravka D smo raztopili v 100 mL 0,1 % H_3PO_4 (pripravljena po postopku 3.3.1.1), vodi MiliQ in 0,01 M NaOH. Pripravili smo po 2 paraleli za vsakega izmed treh topil. Ekstrakcijo smo pospešili z uporabo vibracijskega mešalnika za 5 min in nato še ultrazvoka za 10 min. Odpipetirali smo 2 mL obdelanega vzorca in ga prenesli v 2 mL epico, ki smo jo nato centrifugirali 20 min pri 13.000 obratih na 20 °C. 600 μ L supernatanta smo prenesli v vialo in tako pripravljene vzorce analizirali. Topila smo med seboj primerjali tako, da smo izračunali povprečje meritev dveh paralel vsakega izmed treh topil. Izračunana povprečja smo delili z največjo izmed povprečnih vrednosti in rezultat podali v odstotkih.

3.3.2.10 Priprava raztopin pripravka D v raztopinah metanola

V treh 100 mL bučkah smo raztopili po eno tableto vzorčnega pripravka D v 75, 50 oz. 25 mL vode MiliQ. Ekstrakcijo smo pospešili z uporabo ultrazvoka za 10 min. Nato smo vsako bučko dopolnili z MeOH do 100 mL. Namen navedenega postopka priprave vzorca je bil raztopiti tableto še pred dodatkom MeOH. 2 mL pripravljenega vzorca smo odpipetirali in prenesli v 2 mL epico, ki smo jo nato centrifugirali 20 min pri 13.000 obratih na 20 °C. Raztopino vsake tablete pripravka D smo centrifugirali v treh paralelah. 700 μ L supernatanta smo odpipetirali v vialo in tako pripravljene vzorce analizirali. Meritve tablet, raztopljenih v MeOH raztopinah, smo primerjali med seboj in z meritvami raztopin, ki so bile pripravljene po postopku 3.3.2.9. Izračunali smo povprečje meritev v več paralelah vsakega izmed teh topil in izračunane vrednosti delili z največjo izmed povprečnih vrednosti. Rezultat smo podali v odstotkih.

3.3.2.11 Priprava raztopin pripravka D v vodi MiliQ, 100 mM fosfatnem pufru ter kombinaciji 0,01 M NaOH in 100 mM fosfatnega pufra

Po eno tableto vzorčnega pripravka D smo raztopili v 100 mL vode MiliQ in 100 mM fosfatnega pufra s pH 7 (3.3.1.3). Eno tableto pripravka D pa smo raztopili v 10 mL 0,01

M NaOH. Vse tri bučke smo za 10 min postavili v ultrazvočno kadičko, da so tablete razpadle, nato smo v bučko z 10 mL NaOH dodali 100 mM fosfatni pufer s pH 7 do 100 mL. Iz vsakega vzorca smo pripravili 3 paralele in sicer smo v 2 mL epice odpipetirali po 2 mL vzorca ter centrifugirali 20 min pri 13.000 obratih na 20 °C. 600 µL supernatanta smo odpipetirali v vialo in tako pripravljene vzorce analizirali. Topila smo med seboj primerjali tako, da smo izračunali povprečje meritev treh paralel za vsakega izmed topil. Izračunana povprečja smo delili z največjo izmed povprečnih vrednosti in rezultat podali v odstotkih.

3.3.2.12 Priprava raztopin pripravka D za izračun izkoristka ekstrakcije v različnih volumnih topila

Da bi preverili izkoristke ekstrakcije v različnih volumnih topila, smo po eno tableto pripravka D raztopili v 25, 50, 100 in 200 mL 100 mM fosfatnega pufera s pH 7, ki je bil pripravljen po postopku v poglavju 3.3.1.3. Za testiranje vsakega volumna smo pripravili 3 paralele vzorcev. Bučke smo za 10 min postavili v ultrazvočno kadičko, nato pa odpipetirali 2 mL iz vsakega vzorca in alikvote prenesli v 2 mL epice. Te smo 20 min centrifugirali pri 13.000 obratih na 20 °C. 600 µL supernatanta smo prenesli v vialo in analizirali s sistemom HPLC. Za posamezen vitamin smo izračunali povprečje meritev treh paralel vsakega izmed testiranih volumnov. Povprečne vrednosti smo normirali na 100 mL in dobljene vrednosti med seboj primerjali – delili z največjo izmed teh vrednosti. Kvocient smo izrazili v odstotkih in ta vrednost predstavlja relativni izkoristek ekstrakcije.

3.3.2.13 Priprava raztopin pripravka D za izračun izkoristka ekstrakcije pri različnih načinih pospeševanje ekstrakcije

Načine ekstrakcije smo primerjali tako, da smo eno tableto pripravka D raztopili v 100 mL 0,1 % H_3PO_4 (poglavje 3.3.1.1). Pripravili smo 4 takšne vzorce in pri prvih dveh paralelah sproščanje pospeševali z ultrazvokom, pri drugih dveh pa z vibracijskim mešalnikom. Vzorčili smo po 5-ih, 10-ih in 15-ih minutah postopka in sicer smo odpipetirali 2 mL raztopine, jo prenesli v 2 ml epico in centrifugirali 10 min pri 13.000 obratih na 20 °C. 600 µL supernatanta smo prenesli v vialo in analizirali. Pri analizi vzorcev, kjer smo sproščanje pospeševali z ultrazvokom, smo za posamezen vitamin dobili po dva odziva v vsaki izmed treh časovnih točk vzorčenja in izračunali povprečje teh dveh odzivov. Izkoristek ekstrakcije smo dobili tako, da smo vsa tri izračunana povprečja delili s tistim povprečjem, ki je imelo največjo vrednost. Rezultat smo podali v odstotkih. Tudi pri analizi vzorcev, kjer smo sproščanje pospeševali z uporabo vibracijskega mešalnika, smo dobili po dva

odziva v vsaki izmed treh časovnih točk vzorčenja in izračunali povprečje teh dveh odzivov. Izkoristek ekstrakcije smo izračunali enako, kot je opisano za pospeševanje sproščanja z ultrazvokom in rezultat prav tako podali v odstotkih.

3.3.3 VREDNOTENJE METODE HPLC

3.3.3.1 Priprava standardnih zmesi 1 in 2

Standardna zmes 1 nam je služila kot referenčna raztopina vitaminov B1, B3, B5, B6, B7 in B12. Najprej smo pripravili koncentrirane raztopine standardov vitaminov B1, B3, B5, B6 in B12. Natehtali smo ustrezno količino standarda (preglednica V), ga kvantitativno prenesli v 10 mL bučko in dopolnili do oznake z 1 mM raztopino CK (3.3.1.4). Raztopini vitaminov B5 in B12 smo morali za 10 min postavili v ultrazvočno kadičko, da sta se standarda v celoti raztopila. Nato smo 3,5 mg standarda vitamina B7 natehtali neposredno v 25 mL bučko in v isto bučko odpipetirali ustrezno količino predhodno pripravljenih koncentriranih raztopin (stolpec $V_{\text{koncentrirane raz.}}$ v preglednici V) ter z 1 mM raztopino CK (3.3.1.4) dopolnili do oznake. Koncentracije vitaminov v standardni zmesi 1 so navedene v preglednici V.

Preglednica V: Postopek priprave standardne zmesi 1

Vitamin	Natehtano [mg]	Konc. koncentriranih raztopin [mg/mL]	$V_{\text{koncentrirane raz.}}$ (μL)	Konc. v standardni zmesi 1 [mg/L]
B1	10	1	3500	140
B3	20	1	3500	280
B5	10	1	3500	140
B6	10	1	875	35
B7	3,5	/	/	140
B12	10	1	210	8,4

Standardna zmes 2 je referenčna raztopina standardov vitamina B2 s koncentracijo 140 mg/L in vitamina B9 s koncentracijo 24 mg/L. Pripravili smo jo tako, da smo natehtali 7 mg vitamina B2 in 1,2 mg vitamina B9 ter natehtano kvantitativno prenesli v eno 50 mL bučko. Standarda smo raztopili v 5 mL 0,01 M NaOH, nato pa do oznake dodali 100 mM fosfatni pufer (postopek 3.3.1.3), da smo dobili raztopino z vrednostjo pH okoli 7. Bučko s sveže pripravljeno standardno zmesjo 2 smo ovili v aluminijasto folijo in jo tako zaščitili pred svetlobo.

3.3.3.2 Priprava raztopin za vrednotenje selektivnosti

Za vrednotenje selektivnosti smo analizirali vzorce topil (1 mM raztopino CK, pripravljeno po postopku v poglavju 3.3.1.4, 0,01 M NaOH in 100 mM fosfatni pufer s pH 7, pripravljen po postopku 3.3.1.3), standardne zmesi 1 in standardne zmesi 2, ki smo ju pripravili, kot je opisano v poglavju 3.3.3.1, ter raztopine vzorčnega pripravka D v 100 mM fosfatnem pufru s pH 7. Slednji vzorec smo pripravili tako, da smo eno tableto pripravka D raztopili v 100 mL 100 mM fosfatnega pufru (3.3.1.3) in bučko za 10 min postavili v ultrazvočno kadičko, da je tableta razpadla. V 2 mL epico smo odpipetirali 2 mL pripravljene raztopine, centrifugirali 10 min pri 13.000 obratih na 20 °C, prenesli 600 µL dobljenega supernatanta v vialo in analizirali.

3.3.3.3 Priprava raztopin vitaminov B kompleksa za vrednotenje linearosti, točnosti, ponovljivosti, meje zaznave in meje določitve ter stabilnosti

Kalibracijske in kontrolne raztopine smo pripravili iz standardne zmesi 1 in standardne zmesi 2 (poglavje 3.3.3.1), tako da smo ustrezno količino standardne zmesi redčili s topilom – 1 mM CK (3.3.1.4) pri standardni zmesi 1 in 100 mM fosfatni pufer s pH 7 (3.3.1.3) pri standardni zmesi 2. Koncentracije vitaminov v kalibracijskih in kontrolnih (QC) vzorcih so navedene v preglednici VI.

Preglednica VI: Kalibracijske in kontrolne raztopine vitaminov

Raztopina	Koncentracije vitaminov B kompleksa [mg/L]							
	B1	B2	B3	B5	B6	B7	B9	B12
140 % ¹	140	140	280	140	35	140	24	8,4
120 %	120	120	240	120	30	120	20,6	7,2
110% (QC)	110	110	220	110	27,5	110	18,9	6,6
100 % ²	100	100	200	100	25	100	17,1	6
80 %	80	80	160	80	20	80	13,7	4,8
60 %	60	60	120	60	15	60	10,3	3,6
50 % (QC)	50	50	100	50	12,5	50	8,6	3
40 %	40	40	80	40	10	40	6,9	2,4
25 % (QC)	25	25	50	25	6,25	25	4,3	1,5
20 %	20	20	40	20	5	20	3,4	1,2
10 %	10	10	20	10	2,5	10	1,7	0,6
5 %	5	5	10	5	1,25	5	0,85	0,3
2 %	2	2	4	2	0,5	2	0,34	0,12

¹ 140 % predstavlja standardno zmes 1 oz. standardno zmes 2.

² Raztopina 100 % je vzorec s koncentracijami vitaminov, ki so ekvivalentne deklarirani količini vitaminov v eni tableti večine izbranih pripravkov ob predpostavki, da tableto raztopimo v 100 mL topila.

3.3.4 ANALIZA REALNIH VZORCEV

3.3.4.1 Osnovni postopek priprave realnih vzorcev

Po eno tableto smo raztopili v 100 mL 100 mM fosfatnega pufru s pH 7, ki je bil pripravljen po postopku v poglavju 3.3.1.3. Ekstrakcijo iz tablete smo pospešili z uporabo ultrazvoka za 10 min. 2 mL raztopine smo z avtomatsko pipeto prenesli v 2 mL epico in centrifugirali 10 min pri 13.000 obratih na temperaturi 20 °C. V vialo smo odpipetirali 800 µL dobljenega supernatanta in vzorec analizirali s sistemom HPLC.

3.3.4.2 Optimiziran postopek priprave za posamezen realni vzorec

Osnovni postopek priprave realnih vzorcev (poglavje 3.3.4.1) smo dodatno optimizirali za posamezen pripravek. Pogoji, ki smo jih uporabili, so navedeni v preglednici VII.

Preglednica VII: Optimalni pogoji ekstrakcije za posamezen pripravek

Pripravek	Ultrazvok [min]	Modifikacija osnovnega postopka
A	10	Zaradi nizke deklarirane vsebnosti (odmerki za otroke) smo 4 tablete raztopili v 100 mL topila. Tableto smo zaradi velikosti (širše od grla bučk) zdrobili in dele tablete kvantitativno prenesli v bučko.
B	10	Tableto smo zaradi velikosti (širše od grla bučk) zdrobili in dele tablete kvantitativno prenesli v bučko.
C	2 × 10	/
D	10	/
E	10	/
F	3 × 10	/
G	10	Tableto smo zdrobili, ker ni v celoti razpadla, in praškaste delce kvantitativno prenesli v bučko. Po ultrazvoku smo nastalo suspenzijo še 15 min mešali na magnetnem mešalu, da so se učinkovine sprostile v celotnem obsegu.
H	10	Tableto smo zdrobili zaradi podaljšane sproščanja in praškaste delce kvantitativno prenesli v 200 mL bučko. Po ultrazvoku smo nastalo suspenzijo še 15 min mešali na magnetnem mešalu, da so se učinkovine sprostile v celotnem obsegu. Ker ima pripravek H drugačno razmerje

		vitaminov kot ostali izbrani pripravki, smo pripravljeno raztopino vrednotili na treh ravneh.
--	--	---

3.3.4.3 Priprava vzorcev za vrednotenje ponovljivosti priprave in vsebnosti

Za vrednotenje ponovljivosti in vsebnosti v realnih vzorcih smo pripravili 5 paralel raztopin za vsakega izmed izbranih pripravkov (po postopkih v poglavjih 3.3.4.1 in 3.3.4.2). Pri eni izmed paralel smo iz bučke vzeli tri 2 mL vzorce, jih centrifugirali po opisanem postopku (3.3.4.1) in analizirali. Rezultate teh vzorcev smo uporabili za izračun ponovljivosti postopka znotraj tablete. Skupaj z meritvami v ostalih štirih paralelah realnih vzorcev smo izračunali ponovljivosti postopka med tabletami in vsebnost vitaminov B kompleksa v pripravkih.

3.3.4.4 Priprava vzorcev za vrednotenje izkoristka ekstrakcije

Za vrednotenje izkoristka ekstrakcije smo pripravili 3 vrste vzorcev – zmes standardov, realni vzorec in realni vzorec, ki je obogaten z dodatkom standardov vitaminov. Po postopku 3.3.3.1. smo pripravili raztopini standardov, ki imata 2-krat višje koncentracije kot standardna raztopina 1 oz. standardna raztopina 2. Po 1 mL vsake izmed pripravljenih raztopin smo odpipetirali v 2 mL epico, da smo dobili zmes standardov s prepolovljenimi koncentracijami vitaminov glede na pripravljene raztopine. Iz istih raztopin standardov smo pripravili 3 paralele zmesi standardov. Realne vzorce smo dobili tako, da smo tableto vsakega izbranega pripravka raztopili, kot je opisano v postopkih v poglavjih 3.3.4.1 in 3.3.4.2. Posamezen realni vzorec smo pripravili v treh paralelah in 2 mL alikvot prenesli v 2 mL epice. Realni vzorec, ki je obogaten z dodatkom standardov vitaminov, pa smo dobili tako, da smo v 2 mL epico odpipetirali 0,5 mL vsake izmed pripravljenih raztopin standardov (pred centrifugiranjem) in dodali 1 mL raztopine enega izmed pripravljenih realnih vzorcev (pred centrifugiranjem). Za vsako paralelo realnega vzorca smo pripravili en takšen obogaten vzorec in 2 mL alikvot odpipetirali v 2 mL epico. Tako pripravljene vzorce smo centrifugirali pri pogojih, kot so navedeni v poglavju 3.3.4.1. 700 μ L dobljenega supernatanta smo odpipetirali v vialo in analizirali. Na osnovi meritev treh paralel zmesi standardov smo izračunali povprečje meritev zmesi standardov za posamezen vitamin in te vrednosti nato uporabili pri vrednotenju ekstrakcije.

3.4 VREDNOTENJE METODE HPLC

Analizno metodo smo validirali skladno s smernicami ICH za vrednotenje analiznih metod [29]. Preverjali smo naslednje validacijske parametre: selektivnost, linearnost, točnost, ponovljivost, mejo zaznave, mejo določitve in stabilnost vzorcev. Vzorce smo pripravili, kot je navedeno v poglavju 3.3.3.

3.4.1 SELEKTIVNOST

Selektivnost analizne metode za ugotavljanje vsebnosti vitaminov B kompleksa smo preverjali z analizo raztopin standardov (priprava 3.3.3.1). Ugotavljali smo, če se kromatografski vrhovi analitov med seboj ustrezno ločijo in jih primerjali s kromatogrami uporabljenih topil (voda MiliQ, 0,01 M NaOH, 100 mM fosfatni pufer s pH 7) in stabilizatorja (1 mM raztopina CK). Dodatno smo selektivnost vrednotili na raztopini vzorčnega komercialnega pripravka, da bi odkrili morebitno koelucijo vitaminov in prisotnih pomožnih snovi. Analite v vzorcih smo detektirali pri 210 in 280 nm.

3.4.2 LINEARNOST

Linearnost analizne metode smo vrednotili vsak dan validacije posebej, s sveže pripravljenimi osnovnimi raztopinami standardov. Analizirali smo 10 kalibracijskih vzorcev s koncentracijami vitaminov, ki so navedene v poglavju 3.3.3.3. Umeritvene premice posameznega vitamina smo izrisali z metodo najmanjših kvadrantov in izračunali pripadajoče enačbe ter determinacijske koeficiente (R^2). Za mejo sprejemljivosti smo postavili kriterij $R^2 \geq 0,999$.

3.4.3 TOČNOST IN PONOVLJIVOST

Parameter točnosti smo vrednotili na treh koncentracijskih nivojih znotraj dne. Iz enačb umeritvenih premic smo izračunali koncentracijo posameznih vitaminov v kontrolnih vzorcih (priprava v poglavju 3.3.3.3) in točnost podali kot razmerje med izračunano in dejansko koncentracijo, izraženo v odstotkih. Za mejo sprejemljivosti smo postavili interval $100 \pm 5 \%$.

Za vrednotenje ponovljivosti smo preverjali stopnjo ujemanja odzivov znotraj dne. Analizirali smo po tri paralele vsakega izmed treh koncentracijskih nivojev raztopine standardov (priprava v poglavju 3.3.3.3). Za posamezno koncentracijo smo preverili tudi ponovljivost injiciranja in sicer smo isti kontrolni vzorec injicirali 6-krat. Parameter smo

izrazili kot relativni standardni odklon (RSD) in za mejo sprejemljivosti določili $RSD \leq 5\%$. Meja sprejemljivosti za ponovljivost injiciranja pa je $RSD \leq 2\%$.

3.4.4 MEJA ZAZNAVE IN MEJA DOLOČITVE

Mejo zaznave (LOD) in mejo določitve (LOQ) smo izračunali na podlagi standardnega odklona odsekov umeritvenih premic na ordinati (σ) in povprečne vrednosti naklona umeritvenih premic (S) s pomočjo enačb $LOD = \frac{3,3 \sigma}{S}$ in $LOQ = \frac{10 \sigma}{S}$.

3.4.5 STABILNOST VZORCEV

Stabilnost vitaminov smo vrednotili na treh koncentracijskih nivojih pri temperaturi 25 °C. Iste kontrolne vzorce (3.3.3.3) smo analizirali v treh časovnih točkah – ob času 0, po 16-ih in 24-ih urah. Odziv po določenem času smo primerjali z začetnim odzivom in kvocient podali v odstotkih. Za spodnjo mejo sprejemljivosti smo določili 95 %.

3.5 ANALIZA REALNIH VZORCEV

3.5.1 OPTIMIZACIJA DETEKCIJE

Za namene analize realnih vzorcev smo vrednotili površino kromatografskih vrhov, razen pri vitaminu B3, kjer smo uporabili višino kromatografskega vrha. Pri pripravkih C, E, F in G se zaradi koelucije delno prekrije kromatografski vrh vitamina B3 in meritve površine pod krivuljo ne dajo relevantnih rezultatov. Ima pa vitamin B3 izrazito visok kromatografski vrh, ki kljub močnemu šumu izstopa in omogoča pridobitev verodostojnih meritev. Da smo dobili primerljive rezultate, smo se odločili, da bomo višino vrha vitamina B3 vrednotili pri vseh izbranih pripravkih.

3.5.2 VREDNOTENJE PONOVLJIVOSTI PRIPRAVE VZORCA

V sklopu vrednotenja ponovljivosti priprave realnih vzorcev smo vrednotili ponovljivost priprave vzorca znotraj ene tablete in med različnimi tabletami pri pripravkih A–H. Vzorce smo pripravili, kot je opisano v poglavju 3.3.4.3. Izračunali smo povprečje odzivov in rezultat podali kot RSD. Pri ponovljivosti priprave vzorca smo določili mejo sprejemljivosti $RSD \leq 10\%$.

3.5.3 VREDNOTENJE IZKORISTKA EKSTRAKCIJE

Izkoristek ekstrakcije smo izračunali na podlagi odziva realnega vzorca, ki je bil obogaten z dodatkom standardov vitaminov ($V + S$), odziva realnega vzorca (V) in povprečja meritev zmesi standardov (S) s pomočjo enačbe: $\frac{(V+S) - V/2}{S/2} \times 100\%$. Rezultat smo podali

v odstotkih in izračunali povprečje rezultatov za posamezen vitamin v izbranem pripravku. Vzorce za izračun izkoristka smo pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.3.4.4. Pomembno je, da sta bila vzorca pripravka, ki se nahajata v realnem vzorcu (V) in realnem vzorcu, ki je bil obogaten z dodatkom standardov vitaminov (V + S), pripravljena iz raztopine iste tablete. Za mejo sprejemljivosti smo določili kriterij $100 \pm 10 \%$.

3.5.4 IZRAČUN VSEBNOSTI

Priprava vzorcev za ugotavljanje vsebnosti vitaminov B kompleksa je opisana v poglavju 3.3.4.3. Pripravili smo več paralel realnih vzorcev in na osnovi teh meritev ter povprečja treh umeritvenih premic, ki smo jih dobili pri validaciji metode, izračunali koncentracije posameznih vitaminov v vzorcu. Nato smo iz dobljenih koncentracij in volumna topila, ki smo ga uporabili pri pripravi realnega vzorca, izračunali še maso posameznega vitamina v eni tableti. Preko razmerja molekulske mase (M) kemijske oblike vitamina, ki je navedena na ovojnini, in M standarda smo izračunali mase posameznih vitaminov v tableti za oblike, kakršne so v pripravkih. Rezultat smo izrazili kot $x \pm \sigma$, kjer je x povprečje dejanskih količin vitamina v eni tableti (v mg) in σ standardni odklon. Za izračun vsebnosti smo dejanske količine vitamina primerjali z deklariranimi vrednostmi in kvocient podali v odstotkih. Vsebnost smo zapisali kot $x\% \pm \sigma\%$, kjer je $x\%$ povprečje izračunanih vsebnosti za eno tableto (v odstotkih) in $\sigma\%$ standardni odklon. Rezultati vrednotenja vsebnosti so podani za obliko vitamina, ki je deklarirana na ovojnini zadevnega pripravka.

3.6 OBDELAVA PODATKOV

Podatke, pridobljene z metodo HPLC, smo obdelali s programsko opremo MS Excel. Rezultate smo statistično ovrednotili preko izračuna povprečnih vrednosti, σ , RSD in R^2 . S pomočjo programa MS Excel smo izrisali tudi vse umeritvene premice in jim določili pripadajoče enačbe.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

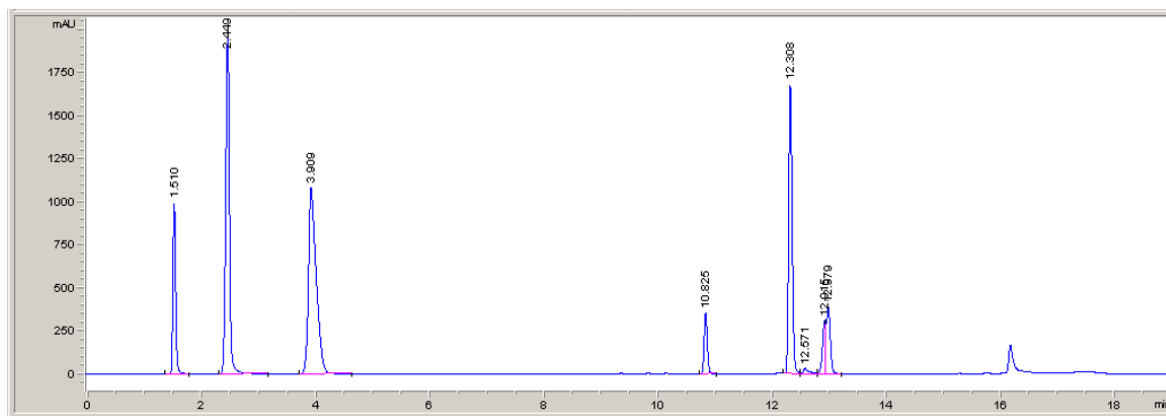
Cilj magistrske naloge je bil razviti enostavno in hitro analizno metodo za sočasno vrednotenje vseh osmih vitaminov B kompleksa. Hkrati smo razvili tudi postopek priprave vzorcev za trdne farmacevtske oblike, ki nam je omogočil implementacijo validirane metode na realne vzorce.

4.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA ANALIZNE METODE

4.1.1 KROMATOGRAFIJA

Razvoj metode

Za izhodišče smo vzeli metodo HPLC, ki je bila razvita v Laboratoriju za stabilnost Fakultete za farmacijo v Ljubljani in je namenjena detekciji manjšega števila vitaminov B kompleksa (B1, riboflavin fosfat (B2 fosfat), B3, B5, B6 in B12). Analiza vodne raztopine zmesi standardov teh šestih vitaminov in vitamina B2 (3.3.2.1) je pokazala ustrezno selektivnost kromatografskih vrhov (slika 9), zato smo obdržali analitsko kolono Luna C18 $150 \times 4,6$ mm, $5 \mu\text{m}$ in mobilno fazo – 0,1 % (m/v) H_3PO_4 in ACN. Nista se ločila edino drugi kromatografski vrh riboflavin fosfata in kromatografski vrh vitamina B2. Valovna dolžina detekcije je bila 210 nm in je zaradi dobljenih primernih odzivov nismo več spreminjali.

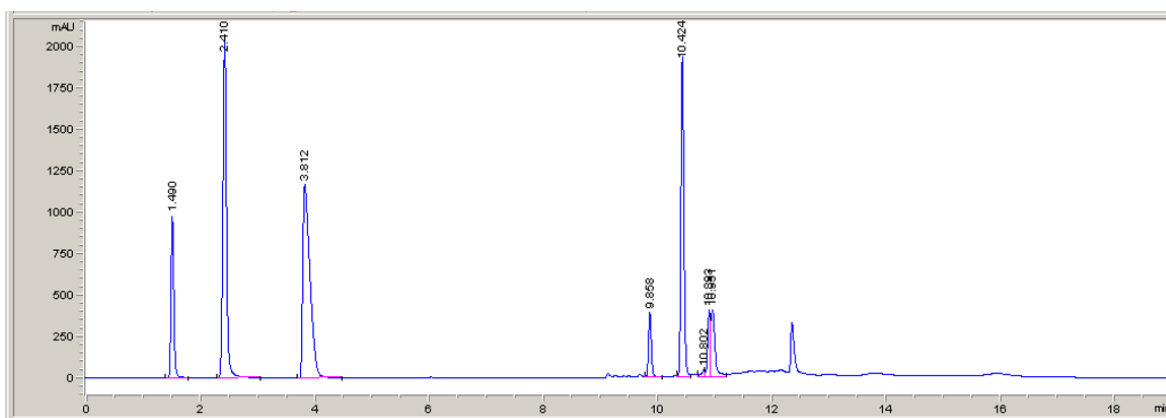


Slika 9: Kromatogram izhodiščne metode (t_r : B1 1,5 min; B3 2,4 min; B6 3,9 min, B5 10,8 min; B12 12,3 min, B2 fosfat 12,6 in 12,9 min; B2 13,0 min)

Vitamini B kompleksa so strukturno zelo različni, zato je bil izziv razviti enostavno metodo, ki bi ločila vse vitamine v relativno kratkem času. Da bi skrajšali čas analize, izboljšali ločbo in optimizirali obliko kromatografskih vrhov, smo spreminjali gradientno izpiranje – delež organskega modifikatorja in program izpiranja – ter pretok mobilne faze.

Izhodiščna metoda loči analite v dve skupini. V prvi so bolj polarni vitamini (B1, B3, B6), ki se hitro izločijo in zadovoljivo ločijo med seboj že z izokratskim izpiranjem (pri 0 % ACN). Tudi kromatografski vrhovi so bili simetrični, zato tega, prvega dela analize metode nismo spreminjali in pri vseh sledečih metodah začeli izpiranje samo z 0,1 % H_3PO_4 , brez dodanega ACN. Druga skupina zajema manj polarne vitamine (B5, B12, B2 fosfat, B2), ki za izpiranje potrebujejo dodatek organskega modifikatorja. ACN smo začeli dodajati v 5. min analize, ker pa med 5. in 10. min ni prišlo do izpiranja analitov, smo izpiranje prilagodili.

Pri metodi 1 (preglednica IV) smo manj polarne vitamine želeli približati z optimizacijo gradienta – skrajšali smo čas naraščanja gradienta in uvedli enominutno vzdrževanje deleža organskega modifikatorja. S tem smo skrajšali čas izpiranja, časovni interval med kromatografskimi vrhovi pa je ostal (slika 10). Ločljivost vrhov vitaminov B2 fosfat in B2 se ni izboljšala.

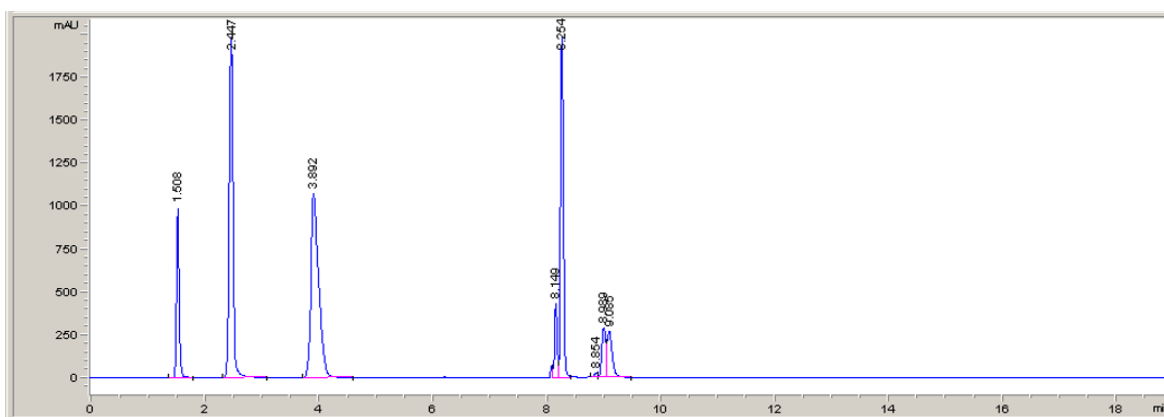


Slika 10: Kromatogram metode 1 (t_r : B1 1,5 min; B3 2,4 min; B6 3,8 min; B5 9,9 min; B12 10,4 min, B2 fosfat 10,8 in 10,9 min; B2 10,9 min)

Z metodo 2 (preglednica IV) smo preverili, kako povečanje pretoka mobilne faze vpliva na ločbo vitaminov in na skrajšanje časa izpiranja. Pretok 1,5 mL/min je skrajšal t_r manj polarne skupine za okoli 4 min v primerjavi z izhodiščno metodo. Kromatografski vrhovi so ostali med seboj ustrezno ločeni, le drugi kromatografski vrh B2 fosfata in kromatografski vrh vitamina B2 sta se popolnoma prekrila, zato smo se odločili, da bomo pri nadaljnjem razvoju raje izhajali iz metode 1.

Pri metodah 3–9 (preglednica IV) smo preizkušali vpliv spremembe deleža organskega modifikatorja in skladno s povzročenimi spremembami preoblikovali tudi program izpiranja. Izkazalo se je, da se časovni interval med polarno in manj polarno skupino

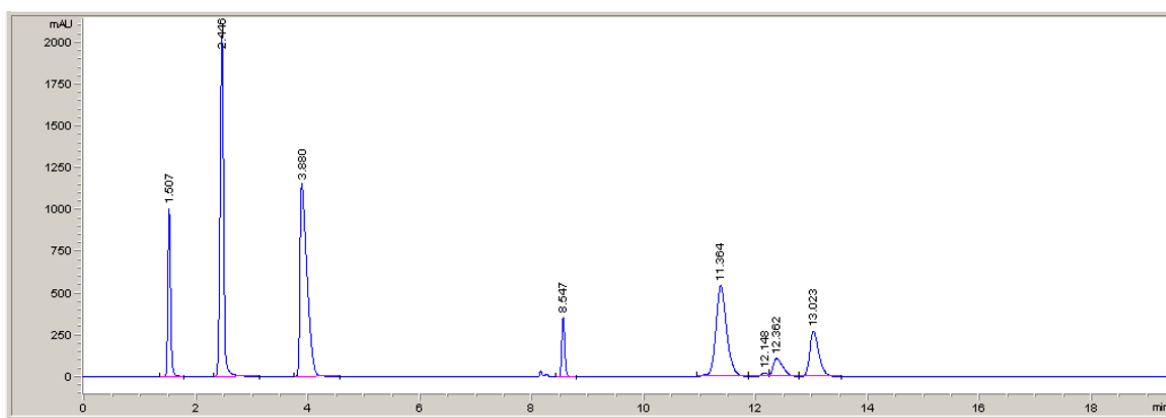
vitaminov zmanjša, če dodamo manj ACN. Delež ACN smo zmanjševali postopoma. Najprej smo poskusili s stopenjskim naraščanjem gradienta (metode 3–5). Pri tem se je drugi kromatografski vrh B2 fosfata boljše ločil od vitamina B2, sta se pa kromatografska vrhova B2 fosfata in kromatografski vrh vitamina B5 združila s kromatografskim vrhom vitamina B12. Z zmanjševanjem deleža ACN se je ločljivost vitaminov B12 in B2 fosfata izboljšala, ne pa tudi ločljivost vitamina B5 in B12. Nato smo z metodami 6–9 poskusili z vzdrževanjem določenega odstotka ACN. Tudi pri teh poizkusih je prišlo do prekrivanja kromatografskih vrhov vitaminov B5 in B2 fosfata s kromatografskim vrhom vitamina B12, kar se je izboljševalo z zmanjševanjem deleža ACN. Manjši delež ACN je ugodno vplival na ločljivost vitaminov manj polarne skupine vitaminov, je pa podaljševal t_r , kar smo kompenzirali s čimprejšnjim začetkom dodajanja organskega modifikatorja. Gradientno ločbo smo uvedli takoj po končanem izpiranju bolj polarne skupine vitaminov (4,5 min), in sicer smo hitro dvignili nivo ACN in ga nato več minut vzdrževali. Ta kombinacija se je izkazala za najprimernejšo glede na razlike v polarnosti vitaminov B kompleksa (slika 11).



Slika 11: Kromatogram metode 9 (t_r : B1 1,5 min; B3 2,4 min; B6 3,9 min, B5 8,1 min; B12 8,3 min, B2 fosfat 8,9 in 9,0 min; B2 9,1 min)

Z metodami 10–15 (preglednica IV) smo preizkušali različne pogoje, da bi optimizirali ločljivost kromatografskih vrhov manj polarne skupine analitov. Poskusili smo s stopenjskim naraščanjem gradienta (metodi 11 in 12), z naraščanjem gradienta z vzdrževanjem deleža ACN (metode 13–15) in kombinacijo obeh programov izpiranja (metoda 10) pri manjših deležih organskega modifikatorja (10–20 %), saj se je izpiranje z manjšim odstotkom ACN pri prejšnjih poskusih izkazalo za primeren pristop k izboljšanju ločljivosti. Pri pogojih metode 13 so kromatografski vrhovi vitaminov B5 in B12 ter B2 fosfat in B2 ustrezno ločeni, je pa čas analize relativno dolg (25 min). Vidna sta tudi dva

kromatografska vrhova B2 fosfata, a sta združena. Da bi ju ločili, smo poskusili z dodatkom manjšega deleža ACN (metoda 14), vendar je bilo 10 % ACN premalo, da bi se vitamini B12, B2 fosfat in B2 sprali s kolone. Pri metodi 15 smo izbrali vmesni odstotek ACN, kar je skrajšalo t_r , a se je ločljivost kromatografskih vrhov zopet zmanjšala. Povečanje pretoka na 1,2 mL/min (metoda 16) je t_r ustrezno skrajšalo. Da bi izboljšali ločljivost, smo pri povečanem pretoku (1,2 mL/min) poskusili še 13 % ACN (metoda 17), pri čemer so se vsi kromatografski vrhovi ustrezno ločili. Vidna sta bila tudi dva kromatografska vrhova B2 fosfata. Pri istih kromatografskih pogojih smo preverili še t_r pri pretoku 1 mL/min (metoda 18). Analiti so se izločili proporcionalno kasneje (slika 12), a smo se odločili, da je pretok 1 mL/min ustrežnejši, saj je metoda namenjena vrednotenju vitaminov v realnih vzorcih, kjer lahko pride do koelucije prisotnih pomožnih snovi.



Slika 12: Kromatogram metode 18 (t_r : B1 1,5 min; B3 2,4 min; B6 3,9 min, B5 8,5 min; B12 11,4 min, B2 fosfat 12,1 in 12,4 min; B2 13,0 min)

Naknadno smo v nabor analitov dodali še vitamin B7, vitamin B9 in vitamin C. Pri metodi 18 na novo vključeni vitamini niso interferirali z ostalimi vitamini, zato izbranih pogojev ni bilo potrebno spreminjati. Izkazalo pa se je, da se B7 kot zadnji analit izloči pri t_r 13,5 min, zato smo skrajšali vzdrževanje gradienta do 14. minute in čas analize skrajšali na 18 minut. Metoda 19 (preglednica IV) je ustrezala našemu namenu in smo jo v nadaljevanju validirali.

Testiranje razvite metode na pripravkih

Metodo 18 smo testirali na pripravkih A, B in F (postopek 3.3.2.3), da bi preverili ustreznost razvite metode za uporabo na realnih vzorcih in po možnosti pred validacijo prilagodili kromatografske pogoje.

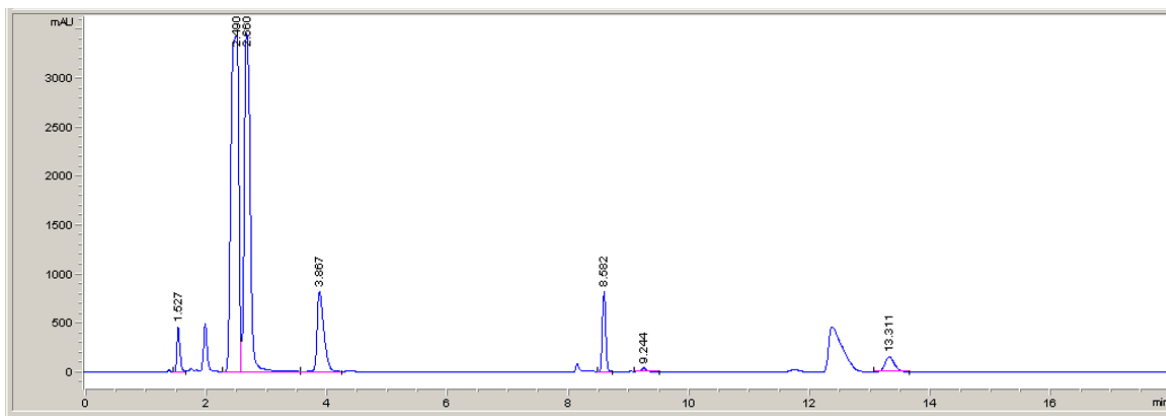
Izločitev riboflavin fosfata

Ugotovili smo, da v izbranih pripravkih z vitamini B kompleksa (poglavje 3.1.1) ni riboflavin fosfata, ampak le čisti riboflavin. Ker ima riboflavin fosfat dva kromatografska vrhova (dva izomera) in je dodatno vključen še čisti riboflavin, je vrednotenje vitaminov B2 fosfat in B2 oteženo, kar nam je tudi povzročalo težave pri razvoju analizne metode. Ugotovili smo, da prihaja do pretvorbe med oblikami riboflavin fosfata ter tudi med riboflavin fosfatom in riboflavinom. Ker so vse te oblike vitamina B2 med seboj v ravnotežju, smo, da bi zagotovili točno kvantifikacijo riboflavina, riboflavin fosfat izločili iz nabora analitov.

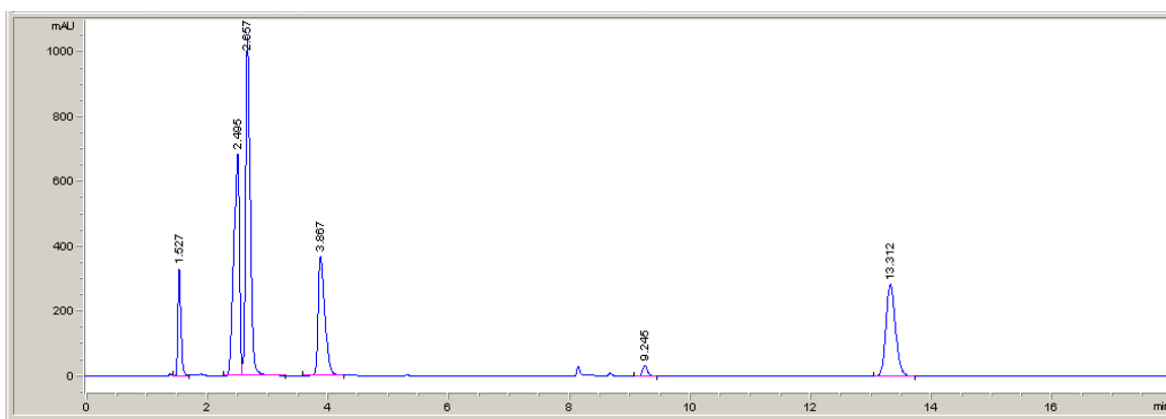
Pri pregledu pripravkov z vitamini B kompleksa (preglednici I in II) smo ugotovili, da vsebujejo riboflavin v obliki soli samo sirupi in nobena trdna farmacevtska oblika. Z izločitvijo riboflavin fosfata smo si olajšali delo, a je razvita analizna metoda kljub temu primerna tudi za analizo riboflavin fosfata v sirupih ob ustrezni pripravi vzorca.

Sprememba valovne dolžine detekcije

Pri valovni dolžini 210 nm absorbira veliko spojin, med drugim tudi pomožne snovi v testiranih izdelkih. Večji del se jih hitro izpere in njihovi kromatografski vrhovi prekrivajo kromatografske vrhove vitaminov s krajšimi t_r (slika 13). Zaradi možnega prekrivanja smo prešli na detekcijo pri valovni dolžini 280 nm, kjer so kromatografski vrhovi prav tako simetrični in ozki ter imajo dovolj visok odziv (slika 14). Trije izmed vitaminov, ki spadajo med manj polarne vitamine B kompleksa – B5, B12 in B7 – pa pri tej valovni dolžini ne oz. zelo slabo absorbirajo. Ker se njihovi kromatografski vrhovi ne prekrivajo s kromatografskimi vrhovi pomožnih snovi v nobenem izmed izbranih pripravkov, smo te tri vitamine selektivno detektirali pri 210 nm.



Slika 13: Kromatogram pripravka B (3.3.2.3) pri valovni dolžini 210 nm (t_r : B1 1,5 min; B3 2,4 min; C 2,7 min; B6 3,9 min; B5 8,6 min; B9 9,2 min; B2 13,3 min)



Slika 14: Kromatogram pripravka B (3.3.2.3) pri valovni dolžini 280 nm (t_r : B1 1,5 min; B3 2,5 min; C 2,7 min; B6 3,9 min; B9 9,2 min; B2 13,3 min)

4.1.2 PRIPRAVA VZORCEV

Tudi razvoj postopka priprave vzorcev je predstavljal svojevrsten izziv zaradi razlik v fizikalnih lastnostih vitaminov B kompleksa, velikega razpona v količini vitaminov znotraj enega pripravka in posameznimi vitamini v različnih zdravilih oz. prehranskih dopolnilih. Želeli smo razviti metodo za pripravo realnih vzorcev. Hkrati je bila zaradi slabe topnosti vitaminov otežena priprava zmesi standardov s sestavo, ki je ekvivalentna sestavi realnih vzorcev, in smo razvili tudi postopek priprave raztopine standardov.

Priprava raztopine standardov

Naš prvi cilj je bila raztopina standardov vseh vodotopnih vitaminov v koncentracijah, ki zajemajo dejanski obseg vsebnosti v pripravkih. Posamezen standard smo natehtali in ga raztopili v vodi MiliQ, da smo dobili raztopino s koncentracijo 1 mg/mL (postopek 3.3.2.4). Vitamini B1, B3, B6 in C so se takoj raztopili, vitamina B5 in B12 je bilo potrebno postaviti v ultrazvočno kadičko za 10 min, da sta se v celoti raztopila, vitamini

B2, B7 in B9 pa se tudi s pomočjo ultrazvoka niso popolnoma raztopili. Ugotovili smo, da je izbira topila ključnega pomena. Preverili smo literaturne podatke za topnost teh treh vitaminov v vodi pri sobni temperaturi (eksperimentalne vrednosti pri temperaturi 25 °C: vitamin B2 84,7 mg/L, vitamin B7 220 mg/L in vitamin B9 1,6 mg/L [30]) ter ugotovili, da je glavni razlog za težave slaba topnost vitaminov v vodi.

Reševanje težav s topnostjo

V raztopini standardov smo želeli koncentracijo vitamina B7 okoli 140 mg/L. Slabo topnost smo obšli tako, da smo vitamin B7 natehtali neposredno v bučko, brez predhodne priprave koncentrirane raztopine in nato dodali ustrezne volumne koncentriranih raztopin ostalih standardov.

Topnost vitaminov B2 in B9 v vodi pri sobni temperaturi je nižja od zelenih koncentracij v raztopini standardov (vitamin B2 140 mg/L, vitamin B9 28 mg/L), zato smo se odločili za pripravo ločene raztopine. V nadaljevanju smo iskali primerno topilo za pripravo raztopine standardov teh dveh vitaminov.

Na podlagi podatka o slabši topnosti vitamina B9 v MeOH [31], smo se odločili, da bomo poskusili z raztapljanjem vitaminov B2 in B9 tudi v drugih topilih. Standarda vitaminov B2 in B9 smo raztapljali v MeOH, ACN, MeOH in ACN v razmerju 1:1 ter v 2-propanolu (poglavje 3.3.2.5). Vitamin B2 se je raztopil le z MeOH v koncentraciji 100 mg/L, vitamin B9 pa z MeOH in 2-propanolom v koncentraciji 50 mg/L. Pri pripravi zmesi standardov vitaminov B2 in B9 v MeOH smo zopet imeli težave s topnostjo in smo bili primorani koncentracije znižati na 40 mg/L (vitamin B2) in 20 mg/L (vitamin B9). Kasneje smo se odločili, da bomo vrednotili vodno raztopino standardov, ker se v MeOH tableta ni raztopila.

Naš drugi pristop k reševanju težav s topnostjo je bila sprememba pH, saj je topnost odvisna od ionizacije spojine oz. pH raztopine. Vitamin B9 je slabo topen v kislem in dobro topen v bazičnih raztopinah [7]. Vitamin B2 je prav tako dobro topen v razredčenih bazah [32], zato smo izbrali topilo z bazičnim pH. V raztopini 0,01 M NaOH sta se vitamina B2 (140 mg/L) in B9 (28 mg/L) popolnoma raztopila (postopek 3.3.2.6), vendar vitamin B2 zaradi previsokega pH ni bil stabilen, kljub dodatku stabilizatorja EDTA. Rešitev smo prilagodili v skladu z ugotovitvami iz članka [3] in sicer smo oba vitamina raztopili v 0,01 M NaOH, nato pa dodali 100 mM fosfatni pufer s pH 7 (postopek 3.3.2.7).

Raztopini standardov vitamina B2 (140 mg/L) in B9 (28 mg/L) smo izmerili pH, ki je bil 7,17. Z raztapljanjem v bazičnem mediju in uravnavanjem pH-ja s pufrom smo zagotovili ustrezno topnost in stabilnost obeh vitaminov. Zaradi zagotovitve linearnosti odzivov smo koncentracijo vitamina B9 naknadno znižali na 24 mg/L in tako pripravljeno raztopino vrednotili.

Da bi koncentracije vitaminov v raztopini standardov ustrezale količinam vitaminov v realnih vzorcih, smo pregledali deklaracije nekaj komercialnih pripravkov. Ugotovili smo, da so razmerja med posameznimi vodotopnimi vitamini primerljiva, in na podlagi tega ter deklariranih vrednosti vitaminov v izbranih pripravkih (3.1.1) določili koncentracije analitov v raztopini standardov.

Standardno zmes 1 smo pripravili tako, da smo v bučko natehtali ustrezno količino vitamina B7 in nato dodali alikvotne raztopine vitaminov B1, B3, B5, B6, B12 in C s koncentracijo 1 mg/L. Standardna zmes 2 pa je vsebovala vitamina B2 in B9, raztopljena v desetini 0,01 M NaOH. Preostanek volumna smo dopolnili s 100 mM fosfatnega pufru, da smo uravnali pH na okoli 7. Standardna zmes 1 in standardna zmes 2 sta nam služili kot referenčni raztopini za vrednotenje vsebnosti vitaminov B kompleksa v pripravkih.

Ugotovili smo, da je raztopina standarda vitamina C pri sobni temperaturi nestabilna že v času med pripravo oz. analizo raztopine. Da bi jo stabilizirali, smo preizkusili 3 antioksidante: BHT, EDTA in CK. Raztopine vitamina C z antioksidantom so bile pripravljene, kot je opisano v postopku 3.3.2.8. Rezultati ugotavljanja stabilnosti vitamina C ob dodatku antioksidantov so v preglednici VIII. Pri dodatku EDTA so bili rezultati stabilizacije najboljši – po 24-ih urah je bilo vitamina C še vedno več kot 98 % glede na začetno koncentracijo. Vendar EDTA zaznavamo pri enakem t_r kot vitamin B3, zato smo za stabilizator raje izbrali CK, ki zadovoljivo stabilizira vitamin C tudi do 7 ur po pripravi raztopine, slabše pa po daljšem času. Najslabši rezultati so bili pri dodatku BHT, najverjetneje zato, ker se primarno uporablja kot antioksidant lipidotopnih spojin [33]. 1 mM raztopino CK smo v nadaljevanju uporabljali kot topilo za pripravo standardne zmesi 1. Kasneje smo se sicer odločili, da vitamina C ne bomo obravnavali in razvito metodo vrednotili samo za vitamine B kompleksa, smo pa kot topilo še naprej uporabljali raztopino CK.

Preglednica VIII: Stabilnost askorbinske kisline, izražena kot razmerje med končno in začetno ($t=0$) koncentracijo, v raztopinah različnih koncentracij in ob dodatku različnih stabilizatorjev

Konc. AK [mg/mL]	BHT		EDTA		CK	
	7 ur [%]	24 ur [%]	7 ur [%]	24 ur [%]	7 ur [%]	24 ur [%]
3,0	0	0	94,2	98,8	92,9	80,3
7,5	10,0	0	98,3	98,6	91,8	76,6
15	45,0	0	100	99,3	95,9	85,7
30	101	98,9	99,5	99,1	94,2	84,8
60	79,4	21,6	99,6	99,0	94,4	83,5
90	88,5	57,8	100	99,4	95,3	86,3
120	88,7	61,4	99,5	99,6	95,9	88,5
150	91,1	71,7	100	99,9	96,1	88,3

Literaturni podatki navajajo nestabilnost vitamina B9, še posebej v raztopinah skupaj z vitaminom B2, in fotosenzibilnost obeh vitaminov [4]. V standardni zmesi 2 sta bila vitamina B2 in B9 stabilna. Kljub temu smo se odločili, da bomo sveže pripravljeno raztopino ovili v aluminijasto folijo in jo tako zaščitili pred svetlobo.

Razvoj priprave realnih vzorcev

Glede na deklarirane količine vitaminov in koncentracijsko območje linearnosti, smo za pripravo realnih vzorcev izbrali 100 mL bučko in v njej raztopili po eno tableto pripravka. Da bi našli primerno topilo za pripravo, smo na vzorčnem pripravku D najprej primerjali 3 topila z različnimi vrednostmi pH: 0,1 % H_3PO_4 , vodo MiliQ in 0,01 M NaOH (priprava v poglavju 3.3.2.9). Vitaminov B7 in B12 zaradi izredno nizkih koncentracij (pod LOD) nismo zaznali. Za vitamin B9 v 0,1 % H_3PO_4 nimamo podatkov, ker se v tem topilu ni raztopil, se pa izrazito bolje topi v bazičnem mediju kot v vodi MiliQ. Rezultati ostalih vitaminov so primerljivi med topili, kot je razvidno iz preglednice IX.

Preglednica IX: Relativna primerjava ekstrakcije vitaminov B kompleksa v topilih z različnimi pH

Vitamin	Topila [%]		
	0,1 % H_3PO_4	Voda MiliQ	0,01 M NaOH
B1	100	91,1	90,0
B2	94,4	100	91,6
B3	95,9	100	98,4
B5	99,3	100	98,3
B6	91,8	93,9	100
B7	ND	ND	ND
B9	ND	76,0	100
B12	ND	ND	ND

ND ni najdeno

Ker sta imela vitamin B2 in B9 v MeOH ustrezno topnost, smo preizkusili MeOH še kot topilo za pripravo realnih vzorcev. Po eno tableto pripravka D smo raztopili v 25 %, 50 % in 75 % MeOH, vendar se v predhodno pripravljenih MeOH raztopinah tableta ni raztopila, zato smo jo najprej raztopili v določeni količini vode in nato dodali MeOH (poglavje 3.3.2.10). Naredili smo relativno primerjavo meritev raztopin pripravka D v raztopinah MeOH in v vodnih raztopinah z različnim pH (poglavje 3.3.2.9) – preglednica X. V MeOH je bila manj učinkovita ekstrakcija vitaminov B6 in B9. Ekstrakcija vitamina B6 se je zmanjševala z naraščanjem deleža MeOH v raztopini. Vitamin B3 ima v 50 in 75 % MeOH približno 2-krat višje vrednosti kot v ostalih topilih. Razlog za to je lahko koelucija pomožnih snovi. Vitaminov B7 in B12 zaradi izredno nizkih koncentracij (pod LOD) nismo zaznali. Pri vitaminih B1, B2 in B5 pa so bili odzivi v raztopinah MeOH primerljivi z vodnimi raztopinami. So se pa v MeOH povečali t_r vseh analitov za 0,2–0,9 min. Zaradi neugodnega vpliva MeOH na izkoristek vitaminov B3, B6 in B9 smo se odločili, da organskih topil ne bomo uporabili za pripravo vzorcev.

Preglednica X: Relativna primerjava ekstrakcije vitaminov B kompleksa v vodnih raztopinah metanola in topilih z različnimi vrednostmi pH

Vitamin	Raztopine MeOH [%]			Topila z različnimi vrednostmi pH [%]		
	25 %	50 %	75 %	0,1 % H_3PO_4	Voda MiliQ	0,01 M NaOH
B1	85,7	100	93,7	98,7	89,9	90,8
B2	96,0	99,7	100	93,6	99,1	80,9
B3	47,9	100	95,0	52,7	54,9	54,1
B5	100	97,4	98,3	95,7	96,4	94,7
B6	11,5	8,9	6,0	91,8	93,9	100
B7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B9	49,0	77,2	76,5	ND	76,0	100
B12	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND ni najdeno

V nadaljevanju smo na pripravku D ponovno primerjali tri topila: vodo MiliQ, fosfatni pufer s pH 7 in kombinacijo desetine 0,01 M NaOH ter devetih desetih 100 mM fosfatnega pufera s pH 7 (poglavje 3.3.2.11). pH vseh treh raztopin pripravka D je bil okoli 7 – v raztopini z vodo MiliQ 6,99, pri pufru 6,97 ter pri pufru in NaOH 7,05. Rezultati relativne primerjave ekstrakcije v topilih s pH okoli 7 so v preglednici XI. V vseh treh topilih je ekstrakcija vitaminov B kompleksa primerljiva. Za vitamina B7 in B12 ponovno nimamo podatkov, ker so bile koncentracije v 100 mL bučki pod LOD. Vzdrževanje nevtralnega pH kljub raztapljanju pomožnih snovi, ki bi potencialno lahko povzročile spremembe, pripomore k stabilnosti vitaminov. Voda MiliQ je zato manj primerno topilo za pripravo

realnih vzorcev. Ker pa kombinacija pufra in NaOH ni pokazala večjih prednosti, smo za topilo izbrali fosfatni pufer.

Preglednica XI: Relativna primerjava ekstrakcije vitaminov B kompleksa v topilih s pH okoli 7

Vitamin	Topila s pH okoli 7 [%]		
	Voda MiliQ	Pufer	Pufer in NaOH
B1	98,2	93,0	100
B2	100	96,3	96,5
B3	96,6	97,8	100
B5	98,6	98,4	100
B6	96,9	100,0	96,2
B7	ND	ND	ND
B9	94,2	100	95,4
B12	ND	ND	ND

ND ni najdeno

Količine vitaminov v eni tableti pripravka so različne. Da bi lahko pripravili realni vzorec s koncentracijami v območju linearnosti metode, smo naredili preizkus ekstrakcije vzorčnega pripravka D v različnih volumnih topila (3.3.2.12). Želeli smo preveriti tudi, če bi bila pri raztapljanju tablete v 25 mL topila vidna kromatografska vrhova vitaminov B7 in B12. Relativne vrednosti izkoristkov ekstrakcije v 25, 50, 100 in 200 mL so prikazane v preglednici XII. Izkoristki so v večini večji od 90 %, kar pomeni, da so meritve vsebnosti v različnih volumnih bučk med seboj primerljive. Izjema je vitamin B9, ki ima relativne izkoristke v 25 in 50 mL topila za okoli 30 oz. 60 % večje kot tiste pri 200 oz. 100 mL topila. Primerljive pa so meritve vitamina B9 v 200 in 100 mL topila. Kromatografskih vrhov vitaminov B7 in B12 nismo zaznali.

Preglednica XII: Relativni izkoristek ekstrakcije 1 tablete pripravka D v različnih volumnih topila

Vitamin	Relativni izkoristek ekstrakcije 1 tbl v različnih volumnih topila [%] (N = 3)			
	200 mL	100 mL	50 mL	25 mL
B1	90,3	93,1	100	98,9
B2	99,3	95,7	96,8	100
B3	100	95,7	96,4	91,7
B5	100	96,7	96,8	96,8
B6	100	90,7	93,5	89,2
B7	ND	ND	ND	ND
B9	62,0	61,2	83,0	100
B12	ND	ND	ND	ND

ND ni najdeno

Iskali smo tudi primeren način pospeševanja ekstrakcije vitaminov B kompleksa iz pripravka. Primerjali smo čase raztapljanja vzorčnega pripravka D v 0,1 % H₃PO₄ pri

uporabi ultrazvoka oz. vibracijskega mešalnika v treh časovnih točkah (poglavje 3.3.2.13). Časi raztapljanja so bili med seboj primerljivi (preglednica XIII). Vitamin B2 se je hitreje raztopil pri uporabi ultrazvoka, pri ostalih vitaminih razlik med postopkoma ter različnimi časovnimi točkami ni bilo. Kot najoptimalnejši način ekstrakcije smo izbrali 10 min obdelavo vzorca z ultrazvokom, ki smo ga uporabljali pri nadaljnji pripravi raztopin realnih vzorcev.

Preglednica XIII: Relativni izkoristek ekstrakcije pri različnih načinih in časih pospeševanja ekstrakcije

Vitamin	Ultrazvok [%]			Vibracijski mešalnik [%]		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
B1	99,6	100	99,9	99,1	99,7	100
B2	97,2	99,4	100	69,6	85,7	100
B3	98,4	99,7	100	99,9	100	100
B5	98,7	99,6	100	98,3	99,1	100
B6	100	99,9	99,8	100	99,9	100
B7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B12	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND ni najdeno

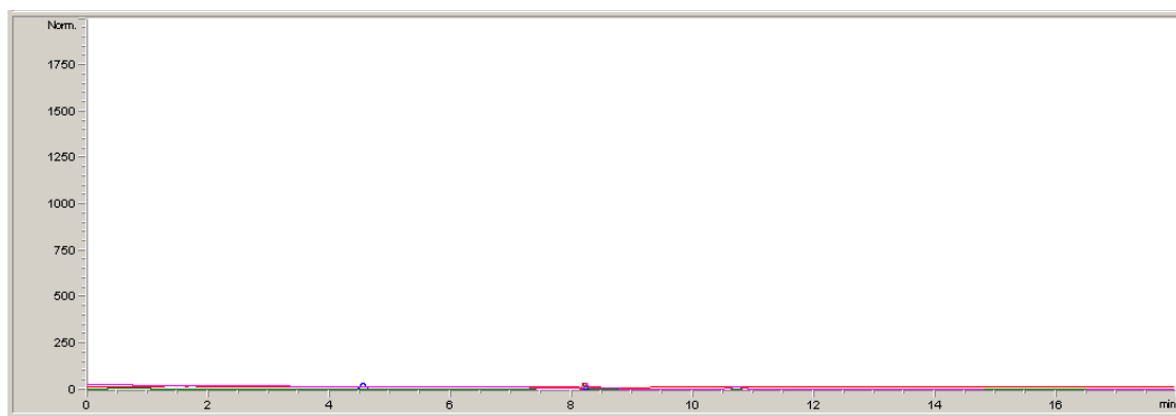
Po razpadu tablete (po pospeševanju ekstrakcije z ultrazvokom) smo dobili suspenzijo. Da bi bil vzorec primeren za kromatografsko analizo, smo ga centrifugirali – 2 mL suspenzije smo prestavili v epico in centrifugirali 10 min pri 13.000 obratih na minuto in temperaturi 20 °C. Supernatant smo prenesli v vialo. Tako pripravljen vzorec je bil primeren za analizo s sistemom HPLC.

4.2 VREDNOTENJE METODE HPLC

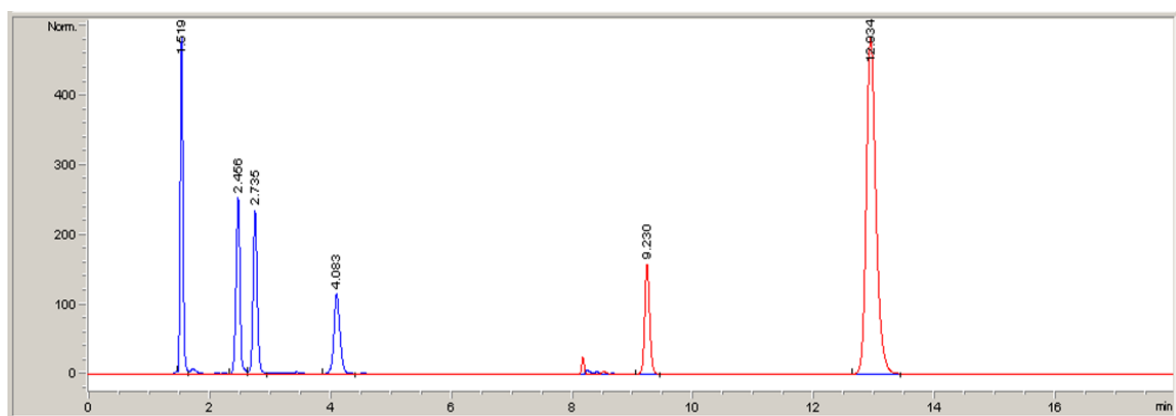
Razvito metodo smo po optimizaciji in razvoju priprave raztopine standardov ovrednotili. S tem smo želeli potrditi ustreznost metode za sočasno vrednotenje vitaminov B kompleksa.

4.2.1 SELEKTIVNOST

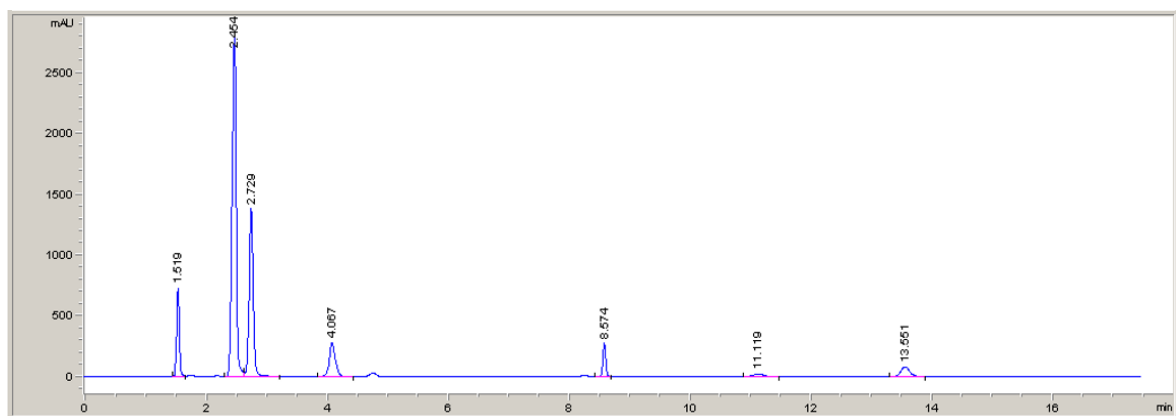
Selektivnost analizne metode smo vrednotili z analizo raztopin standardov, uporabljenih topil (voda MiliQ, 0,01 M NaOH, 100 mM fosfatni pufer s pH 7) in stabilizatorja (1 mM CK) ter raztopine vzorčnega pripravka D (3.3.3.2). Ugotovili smo, da se kromatografski vrhovi vitaminov B kompleksa pri detekciji z valovno dolžino 210 nm in 280 nm ne prekrivajo med seboj ali s topili (slike 15–17). Prav tako ne prihaja do koelucije pomožnih snovi pripravka D in katerega izmed analitov (sliki 18 in 19).



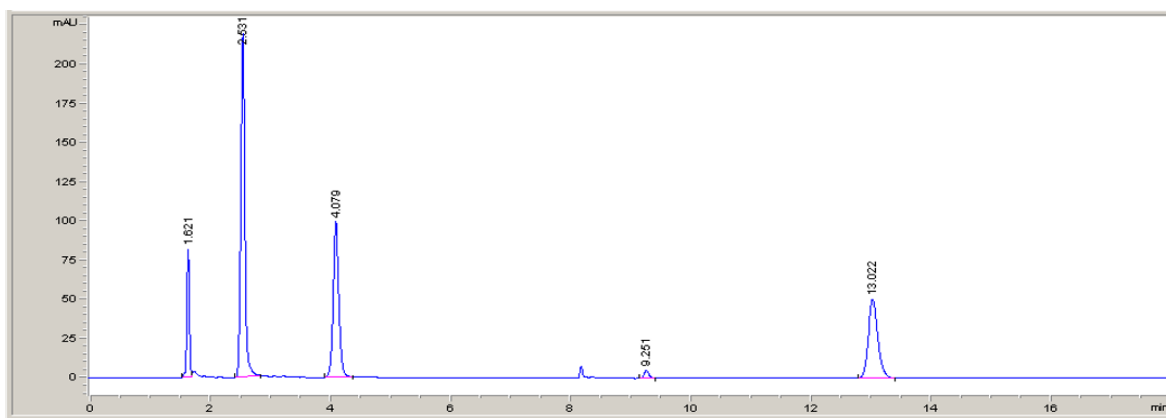
Slika 15: Kromatogrami uporabljenih topil (modra: voda MiliQ in 1 mM CK pri 210 nm, rdeča: voda MiliQ in 1 mM CK pri 280 nm, zelena: fosfatni pufer s pH 7 in 0,01 M NaOH pri 210 nm, roza: fosfatni pufer s pH 7 in 0,01 M NaOH pri 280 nm)



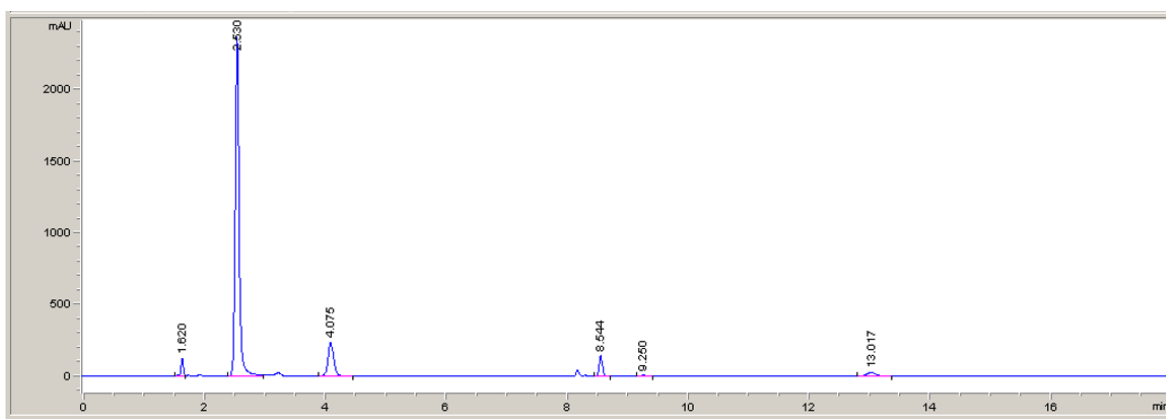
Slika 16: Kromatogram standardne raztopine 1 (modra) in standardne raztopine 2 (rdeča) pri 280 nm (t_r : B1 1,5 min; B3 2,5 min; C 2,7 min; B6 4,1 min; B9 9,2 min; B2 12,9 min)



Slika 17: Kromatogram standardne raztopine 1 (100 %) pri 210 nm (t_r : B1 1,5 min; B3 2,5 min; C 2,7 min; B6 4,1 min; B5 8,6 min; B12 11,1 min; B7 13,6 min)



Slika 18: Kromatogram raztopine pripravka D (1 tbl/100 mL fosfatnega pufra s pH 7) pri 280 nm (t_r : B1 1,6 min; B3 2,5 min; B6 4,1 min; B9 9,3 min; B2 13,0 min)



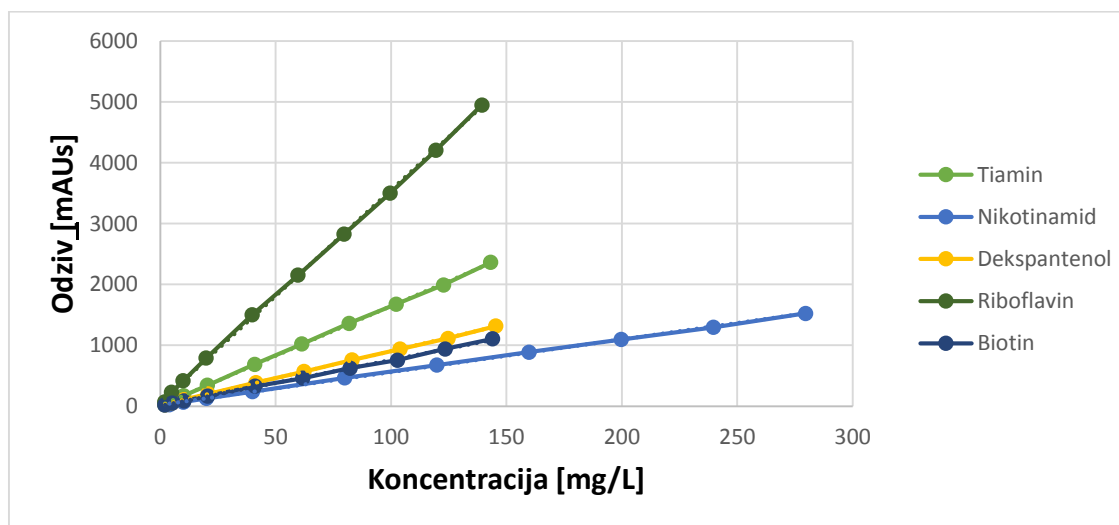
Slika 19: Kromatogram raztopine pripravka D (1 tbl/100 mL fosfatnega pufra s pH 7) pri 210 nm (t_r : B1 1,6 min; B3 2,5 min; B6 4,1 min; B5 8,5 min; B9 9,3 min; B2 13,0 min)

4.2.2 LINEARNOST

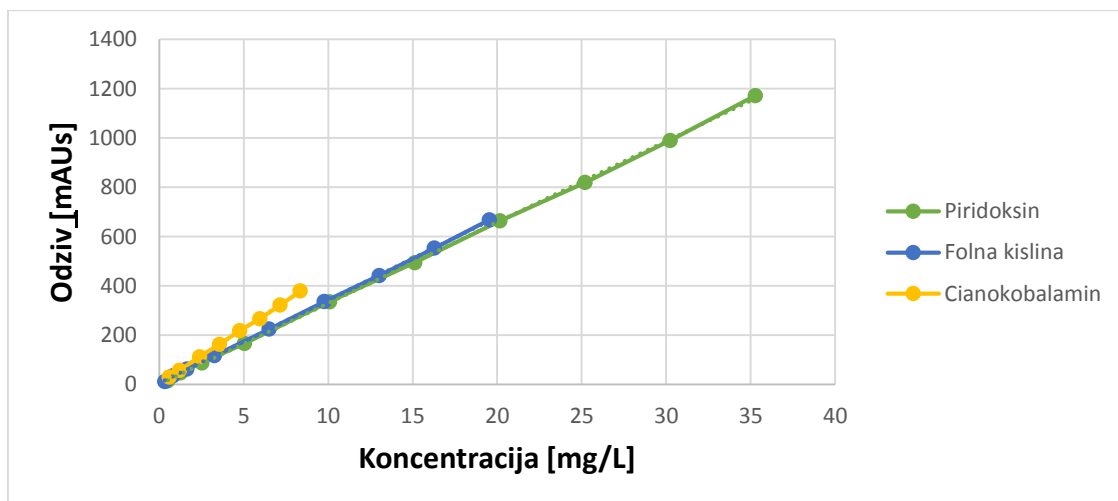
Vse umeritvene premice so imele R^2 boljši od 0,999. Rezultati vrednotenja linearnosti so podani v preglednici XIV. Kromatografskega vrha vitamina B12 pri koncentracijah 0,12 mg/L in 0,30 mg/L nismo zaznali. Zadnji, deseti kalibracijski vzorec vitamina B9 pa je odstopal od postavljenih kriterijev – R^2 je bil manjši od 0,999. Teh točk nismo upoštevali in smo umeritveni premici vitaminov B12 in B9 določili na podlagi osmih oz. devetih kalibracijskih vzorcev. Po prilagoditvi območja linearnosti vitaminov B9 in B12 so bili determinacijski koeficienti vseh analitov znotraj meja sprejemljivosti. Glede na rezultate lahko potrdimo linearnost metode za vse vitamine B kompleksa v izbranih koncentracijskih razponih. Umeritvene premice so izrisane na slikah 20 in 21, ločeno za višje koncentracijsko območje metode (B1, B2, B3, B5, B7) in nižje koncentracijsko območje metode (B6, B9, B12).

Preglednica XIV: Linearnost analizne metode

Vitamin	Koncentracijsko območje [mg/L]	Valovna dolžina [nm]	Umeritvena premica	Naklon	Odsek	R ²
B1	2 – 140	280	1	15,79	12,43	0,9999
			2	15,90	3,037	0,9999
			3	16,38	6,351	0,9998
B2	2 – 140	280	1	35,74	39,03	0,9995
			2	34,19	40,13	0,9996
			3	35,09	57,82	0,9996
B3	4 – 280	280	1	5,545	22,773	0,9996
			2	5,468	19,43	0,9996
			3	5,387	19,18	0,9996
B5	2 – 140	210	1	8,490	15,38	0,9999
			2	7,667	6,682	0,9998
			3	8,912	13,17	0,9999
B6	0,5 – 35	280	1	31,69	7,125	0,9998
			2	31,98	6,644	0,9999
			3	32,57	3,969	0,9998
B7	2 – 140	210	1	7,738	9,568	0,9999
			2	7,644	8,239	0,9991
			3	7,520	6,888	0,9992
B9	0,3 – 20,6	280	1	31,73	1,859	0,9996
			2	32,70	5,297	0,9992
			3	33,75	5,703	0,9999
B12	0,6 – 8,4	210	1	42,11	3,833	0,9996
			2	42,48	3,232	0,9995
			3	44,66	4,130	0,9998



Slika 20: Umeritvene premice vitaminov v višjem koncentracijskem območju metode (3. dan validacije)



Slika 21: Umeritvene premice vitaminov v nižjem koncentracijskem območju metode (3. dan validacije)

4.2.3 TOČNOST IN PONOVLJIVOST

Rezultati vrednotenja točnosti so navedeni v preglednici XV. Pri vseh treh koncentracijskih nivojih je točnost metode ustrezna glede na postavljeni kriterij sprejemljivosti. Nekoliko odstopajo le podatki za vitamin B9, za kar je vzrok nizko koncentracijsko območje tega vitamina.

Preverili smo ponovljivost metode na treh koncentracijah vsakega izmed vitaminov B kompleksa in RSD kontrolnih vzorcev je v skladu z določeno mejo sprejemljivosti. Prav tako je ustrezen RSD ponovljivosti injiciranja, ki ne presega izbrane meje 2 %. Rezultati so podani v preglednici XV.

Preglednica XV: Točnost, ponovljivost in ponovljivost injiciranja analizne metode

Vitamin	Konc. [mg/L]	Točnost [%]	Ponovljivost (RSD [%])	Ponovljivost injiciranja (RSD [%])
B1	25	101,3	0,93	0,34
	50	101,6	1,86	0,17
	110	99,9	0,39	0,10
B2	25	99,9	1,40	0,65
	50	98,8	0,68	0,06
	110	97,7	0,15	0,53
B3	50	103,0	0,18	0,09
	100	101,8	0,42	0,14
	220	99,9	0,09	0,07
B5	25	102,2	0,20	1,16
	50	100,4	0,41	0,46
	110	99,9	0,45	0,16

B6	6,3	101,7	0,33	0,58
	12,5	100,1	0,89	0,48
	27,5	100,2	0,35	0,15
B7	25	101,7	0,91	0,58
	50	100,8	1,69	1,64
	110	101,5	0,63	0,22
B9	4,3	92,6	1,31	0,68
	8,6	87,6	1,55	0,15
	18,9	91,3	1,36	1,15
B12	1,5	101,3	0,70	0,82
	3	100,6	0,62	1,01
	6,6	99,8	0,45	1,42

4.2.4 MEJA ZAZNAVE IN MEJA DOLOČITVE

LOD in LOQ smo izračunali po postopku, opisanem v poglavju 3.4.5. Rezultati za posamezen vitamin so podani v preglednici XVI in LOQ so primerljivi oz. nekoliko višji glede na koncentracijsko območje linearnosti metode (4.2.2).

Preglednica XVI: Meje zaznave in meje določitve posameznih vitaminov B kompleksa

Vitamin	LOD [mg/L]	LOQ [mg/L]
B1	0,98	2,97
B2	0,99	3,01
B3	1,21	3,67
B5	0,59	1,80
B6	0,17	0,53
B7	0,58	1,76
B9	0,21	0,65
B12	0,04	0,11

4.2.5 STABILNOST VZORCEV

Stabilnost vzorcev smo preverjali po postopku, opisanem v poglavju 3.4.5. Podatki o stabilnosti vitaminov so navedeni v preglednici XVII, ločeno za posamezen nivo. Po 36-ih urah je bilo v raztopinah standardov več kot 95 % prvotne koncentracije, s čimer smo potrdili stabilnost kontrolnih vzorcev za čas analize. Nekoliko odstopajo le rezultati za vitamin B9, kar pa je lahko posledica nizkega koncentracijskega območja metode za ta vitamin in s tem povezane slabše točnosti in ponovljivosti (razvidno iz preglednice XV).

Preglednica XVII: Stabilnost vitaminov B kompleksa

Vitamin	Konc. [mg/L]	Stabilnost [%]	
		24 h	36 h
B1	25	98,5	97,8
	50	97,8	97,7
	110	98,4	98,1
B2	25	99,3	92,3
	50	100,1	95,5
	110	99,3	95,7
B3	50	99,5	99,7
	100	100,4	100,3
	220	99,4	99,2
B5	25	98,4	107,7
	50	108,1	105,6
	110	101,6	101,6
B6	6,3	97,5	97,4
	12,5	99,2	99,1
	27,5	97,6	97,6
B7	25	96,8	99,0
	50	95,5	94,6
	110	97,0	96,2
B9	4,3	89,2	92,3
	8,6	90,7	97,8
	18,9	92,0	105,8
B12	1,5	129,3	99,7
	3	94,4	93,6
	6,6	95,6	95,8

Vsi validacijski parametri so znotraj kriterijev sprejemljivosti, zato je razvita analzna metoda primerna za sočasno vrednotenje vitaminov B kompleksa.

4.3 ANALIZA REALNIH VZORCEV

Ovrednoteno metodo in ustrezno pripravo raztopine realnega vzorca smo uporabili za vrednotenje vsebnosti vitaminov B kompleksa v osmih izdelkih – treh zdravilih in petih prehranskih dopolnilih (poglavje 3.1.1).

4.3.1 KARAKTERISTIKE REALNIH VZORCEV

Realne vzorce smo izbrali med pripravki, ki jih je mogoče dobiti na slovenskem trgu in so bili nabavljeni v javni lekarni. Vsebujejo celoten nabor vitaminov B kompleksa (razen pripravkov A in B, ki sta brez vitamina B7), a imajo različne deklarirane vrednosti (preglednica XIX). Pri tem najbolj izstopata priprava A in H, prvi ima manjše količine vitaminov kot ostali, drugi pa večje. V osnovi so izdelki namenjeni različnim populacijam

in je temu prilagojena tudi vsebnost – npr. pripravek namenjen otrokom vsebuje manjše količine vitaminov. Vsi so v obliki tablet, a se tablete med seboj razlikujejo po oblogi in seveda prisotnih pomožnih snoveh. Pri zdravilih so tablete pakirane posamično, v pretisne omote, pri prehranskih dopolnilih pa so v plastenkah. Prav tako je pomemben podatek, da nekateri izmed vzorcev vsebujejo tudi druge učinkovine (vitamin C, lipidotopne vitamine, minerale), saj so glede na FO in kombinacije učinkovin razvrščeni v monografije USP 39 (poglavje 1.2). Podobnosti in razlike vzorcev so navedene v preglednici XVIII.

Preglednica XVIII: Primerjava testiranih realnih vzorcev

Pripravek	Zdravilo oz. prehransko dopolnilo	FO	Ciljna skupina oseb, ki jim je pripravek namenjen	Učinkovine, ki so v pripravku poleg vitaminov B kompleksa
A	zdravilo	obložene tbl (dražeji)	otroci	vit. C, lipidotopni vitamini, minerali
B	zdravilo	obložene tbl (dražeji)	otroci	vit. C, lipidotopni vitamini, minerali
C	zdravilo	filmsko obložene tbl	nosečnice	vit. C, lipidotopni vitamini, minerali
D	prehransko dopolnilo	tbl	odrasli	/
E	prehransko dopolnilo	tbl	starejši od 50 let	vit. C, lipidotopni vitamini, minerali
F	prehransko dopolnilo	filmsko obložene tbl	starejši od 50 let	vit. C, lipidotopni vitamini, minerali, drugo (izvleček ginsenga, polifenoli oljčnega olja)
G	prehransko dopolnilo	tbl	odrasli	vit. C, lipidotopni vitamini, minerali
H	prehransko dopolnilo	tbl – podaljšano sproščanje (6–8 ur)	odrasli	drugo (holin, inozitol)

4.3.2 OPTIMIZACIJA METODE PRIPRAVE VZORCA

Vsak izmed izbranih pripravkov ima drugačne lastnosti (vsebnost, pomožne snovi, obloge itn.), zato je bilo potrebno osnovni postopek priprave realnih vzorcev (3.3.4.1) prilagoditi vsakemu pripravku posebej, da bi bili rezultati ponovljivi in v območju linearnosti. Optimalni pogoji priprave realnih vzorcev, ki smo jih uporabili pri vrednotenju vsebnosti, so navedeni v poglavju 3.3.4.2 Optimiziran postopek priprave za posamezen realni vzorec.

Največ težav smo imeli pri pripravku H, ki ima deklarirane večje količine vitaminov kot ostali pripravki in hkrati še v drugačnem razmerju. Da bi koncentracije v raztopini ustrezale območju linearnosti, smo eno tableto raztopili v 200 mL bučki. To spremembo nam dovoljujejo ustrezni rezultati primerjave ekstrakcije pripravka D v različnih volumnih topila (preglednica XII). Pripravljeno raztopino smo nato analizirali na treh ravneh – volumen injiciranja 20 μ L, volumen injiciranja 4 μ L in volumen injiciranja 4 μ L s predhodnim 4-kratnim redčenjem. V prvi seriji smo ugotavljali vsebnost vitamina B9, v drugi vitaminov B2, B3 in B5 ter v tretji vitaminov B1 in B6. Ena tableta pripravka H vsebuje 17-krat do 100-krat več vitamina B12 kot ostali realni vzorci, zato smo v sklopu prve ravni preverili tudi morebitno prisotnost kromatografskega vrha vitamina B12. Ta ni bil značilno različen od šuma kljub temu, da je imela raztopina, pripravljena pri zgoraj navedenih pogojih, koncentracijo vitamina B12 nad LOQ in v območju linearnosti. Razlog za takšen rezultat je lahko manjša vsebnost ali manjša obstojnost vitamina B12 v pripravku H.

4.3.3 PREVERJANJE METODE NA REALNIH VZORCIH

Da bi preverili uporabnost razvite in validirane metode, smo jo v nadaljevanju aplicirali na realne vzorce. Na vzorcih različnih pripravkov smo dodatno ovrednotili samo metodo, in sicer smo vrednotili ponovljivost priprave realnih vzorcev in izkoristek ekstrakcije. Rezultati so podani v preglednici XIX.

Pri ponovljivosti priprave vzorcev smo preverjali ponovljivost znotraj ene tablete in med različnimi tabletami izbranega pripravka. Meritve znotraj ene tablete in med različnimi tabletami so ponovljive pri vseh vitaminih B kompleksa in pri vseh pripravkih, le v enem primeru je rezultat rahlo nad postavljenimi mejami sprejemljivosti (poglavje 3.5.2). Pri večini pripravkov so vrednosti RSD najvišje za vitamin B9. Vzrok za to je lahko nizka vsebnost vitamina B9 v pripravkih in/ali nekoliko slabši validacijski parametri. Ponovljivost znotraj tablete je pri večini analitov boljša kot ponovljivost med tabletami, zato lahko sklepamo, da je razvita metoda ustrezna za natančno vrednotenje vsebnosti vitaminov B kompleksa v pripravkih. Nekoliko višje vrednosti RSD pri primerjavi odzivov med tabletami so lahko posledica nehomogenosti vzorcev.

Izkoristek ekstrakcije smo ugotavljali, da bi preverili ustreznost priprave realnih vzorcev. Izračunali smo ga, kot je navedeno v poglavju 3.5.3. Velika večina rezultatov ustreza postavljenemu kriteriju, ponekod pa so malo nižji od določene spodnje meje 90 %. Slabši

izkoristek je opazen pri vitaminih B2 in B9. Pri vitaminu B2 je lahko razlog slabša topnost. Pri pripravku H je, na primer, topnost presežena za 5-krat, kar je tudi razlog za visoko vrednost izkoristka. Zelo verjeten vzrok za slab izkoristek vitamina B9 je nizka vsebnost v pripravkih, kar se odraža tudi pri slabših validacijskih parametrih za ta vitamin.

4.3.4 VREDNOTENJE VSEBNOSTI

Vsebnost vitaminov B kompleksa smo vrednotili v pripravkih A–H. V poglavju 3.5.4 je opisana obdelava meritev in način podajanja rezultatov. Rezultati so navedeni v preglednici XIX.

Preglednica XIX: Vsebnost vitaminov B kompleksa v pripravkih

Pripravek	Vitamin	Deklarirana masa vitaminov v tbl [mg]	Ugotovljena masa vitaminov v tbl [mg] *	Vsebnost v tbl [%] *	Izkoristek [%] (N = 3)	Ponovljivost znotraj tbl (RSD) [%] (N = 3)	Ponovljivost med tbl (RSD) [%] (N = 4)
A	B1 ¹	0,25	0,27 ± 0,00	106,7 ± 1,4	101,4	0,37	1,25
	B2	0,3	0,34 ± 0,00	113,5 ± 0,9	97,2	0,15	0,74
	B3	3	4,22 ± 0,03	140,6 ± 1,1	101,0	0,17	1,05
	B5 ³	1,2	1,30 ± 0,01	108,3 ± 0,7	108,8	0,11	0,60
	B6	0,3	0,32 ± 0,00	107,3 ± 0,6	103,3	0,10	0,54
	B7	/	ND	/	/	/	/
	B9	0,04	0,071 ± 0,000	177,2 ± 0,8	94,5	0,53	0,43
	B12	0,0002	ND	/	/	/	/
B	B1 ¹	1,5	1,56 ± 0,02	104,1 ± 1,2	100,8	0,48	1,17
	B2	1,7	2,02 ± 0,02	118,9 ± 1,3	95,0	0,06	1,02
	B3	20	24,65 ± 0,37	123,2 ± 1,9	98,9	0,15	1,45
	B5 ³	10	9,09 ± 0,12	90,9 ± 1,2	102,3	0,18	1,26
	B6	2	2,10 ± 0,03	105,1 ± 1,5	98,6	0,09	1,46
	B7	/	ND	/	/	/	/
	B9	0,4	0,69 ± 0,02	172,5 ± 5,1	95,6	0,02	2,88
	B12	0,006	ND	/	/	/	/
C	B1 ¹	1,55	1,63 ± 0,07	104,9 ± 4,7	90,2	0,44	4,34
	B2	1,8	1,75 ± 0,03	97,1 ± 1,8	80,4	0,75	2,93
	B3	19	20,95 ± 0,23	110,3 ± 1,2	86,4	1,23	3,93
	B5 ³	10	9,73 ± 0,34	97,3 ± 3,4	92,3	0,31	3,45
	B6	2,6	2,63 ± 0,04	101,0 ± 1,4	82,2	0,39	1,37
	B7	0,2	ND	/	/	/	/
	B9	0,2	0,19 ± 0,01	95,4 ± 4,2	103,9	4,69	4,19
	B12	0,004	ND	/	/	/	/
D	B1	1,4	1,90 ± 0,07	135,9 ± 4,7	94,2	2,35	3,38
	B2	1,6	1,75 ± 0,02	109,4 ± 1,2	80,5	0,04	1,05
	B3	18	19,65 ± 0,19	109,2 ± 1,1	93,9	0,26	0,95

	B5 ³	6	6,04 ± 0,07	100,7 ± 1,2	106,6	0,47	1,13
	B6	2	2,26 ± 0,03	112,9 ± 1,6	55,9	0,61	1,41
	B7	0,015	ND	/	/	/	/
	B9	0,2	0,19 ± 0,01	95,4 ± 4,2	62,3	4,69	4,19
	B12	0,001	ND	/	/	/	/
E	B1 ²	1,65	2,16 ± 0,01	131,0 ± 0,5	98,6	0,97	2,35
	B2 ²	2,1	2,23 ± 0,05	106,1 ± 2,4	94,7	1,82	2,76
	B3	24	25,23 ± 0,06	105,1 ± 0,3	86,7	3,78	1,52
	B5 ³	9	8,90 ± 0,17	98,9 ± 1,9	102,0	0,32	1,93
	B6 ²	2,1	2,45 ± 0,04	116,8 ± 2,1	90,5	2,27	1,82
	B7	0,075	ND	/	/	/	/
	B9	0,3	0,40 ± 0,02	132,4 ± 6,7	100,4	5,09	5,18
	B12 ²	0,003	ND	/	/	/	/
F	B1 ¹	1,65	2,55 ± 0,28	154,3 ± 17,1	90,1	0,92	10,89
	B2	2,1	2,08 ± 0,06	98,9 ± 2,8	84,1	1,63	2,66
	B3	24	25,40 ± 0,42	105,8 ± 1,8	88,6	1,23	1,48
	B5 ³	9	11,06 ± 0,12	122,9 ± 1,3	98,5	2,30	1,05
	B6	2	2,28 ± 0,11	123,8 ± 5,4	82,7	0,94	4,31
	B7	0,075	ND	/	/	/	/
	B9	0,2	0,26 ± 0,01	128,9 ± 4,7	102,2	1,21	3,79
	B12	0,0025	ND	/	/	/	/
G	B1 ¹	1,4	1,22 ± 0,05	87,1 ± 3,8	89,7	0,60	4,34
	B2	1,6	0,96 ± 0,10	60,2 ± 6,0	86,6	1,04	1,82
	B3	18	17,88 ± 1,58	99,3 ± 8,8	90,8	0,46	1,39
	B5 ³	6	5,50 ± 0,10	91,6 ± 1,6	102,2	0,49	1,76
	B6	2	2,19 ± 0,06	109,7 ± 3,0	89,0	0,28	2,70
	B7	0,15	ND	/	/	/	/
	B9	0,2	0,12 ± 0,02	62,4 ± 9,4	98,6	3,75	8,92
	B12	0,001	ND	/	/	/	/
H	B1 ¹	100	152,13 ± 1,42	152,1 ± 1,4	93,0	NP	0,93
	B2 ⁴	100	29,73 ± 0,13	29,7 ± 0,1	178,5	NP	0,42
	B3	100	109,06 ± 0,82	109,1 ± 0,8	98,5	NP	0,70
	B5 ³	100	94,22 ± 1,03	94,2 ± 1,0	98,8	NP	1,07
	B6	100	140,72 ± 1,36	140,7 ± 1,4	95,6	NP	0,96
	B7	0,1	ND	/	/	NP	/
	B9	0,4	0,57 ± 0,00	142,7 ± 1,0	100,0	NP	0,66
	B12	0,1	ND	/	/	NP	/

* Računano po formuli $x \pm \sigma$ za ugotovljeno maso in po formuli $x\% \pm \sigma\%$ za izkoristek (poglavje 3.5.4)

¹ V obliki tiaminijevega nitrata – odzivi standardna so ustrezno preračunani.

² Oblika ni definirana. Pri izračunu upoštevana kemijska oblika standarda, ki smo jo uporabili za pripravo raztopine standardov.

³ Izračunane vrednosti se nanašajo na obliko deksipantenol.

⁴ Presežena topnost vitamina.

ND ni najdeno

NP ni podataka

Kriterij ustreznosti za vsebnost vitaminov B kompleksa v pripravkih je določen v ameriški farmakopeji (USP 39) – v trdnih farmacevtskih oblikah (z ali brez mineralov in/ali lipidotopnih vitaminov) ne sme biti manj kot 90,0 % in ne več kot 150 % deklarirane količine vodotopnih vitaminov [22]. Zgornja meja je višja kot pri večini učinkovin, saj so zaradi hitre regulacije koncentracij preko izločanja s sečem hipervitaminoze vitaminov B kompleksa redke [8].

Večina rezultatov vrednotenja vsebnosti ustreza mejam sprejemljivosti v USP 39, šest vrednosti pa je izven določenega intervala. V pripravkih A in B je preveč vitamina B9. Ta se pogosto dodaja v preseženih količinah zaradi neobstoynosti [9], da se ob koncu roka uporabnosti zagotovi ustrezna količina vitamina v pripravku. Nizke koncentracije so problematične tudi za analizo, kar je lahko vzrok za prenizko vsebnost vitamina B9 v pripravku G. V pripravku F je vsebnost vitamina B1 le rahlo nad zgornjo mejo sprejemljivosti. Razlog za odstopanje rezultatov za vitamin B2 v pripravkih G in H je lahko slabša topnost v pripravljenem vzorcu. V pripravku H je bila topnost vitamina B2 presežena, zato je tudi izkoristek tako velik (179 %). Pri pripravku G pa je izkoristek nekoliko pod mejo sprejemljivosti, zato je nizka vsebnost vitamina B2 lahko posledica nepopolne sprostitve učinkovine iz FO.

Vitaminov B7 in B12 zaradi prenizkih vsebnosti nismo zaznali v nobenem izmed testiranih izdelkov. Koncentracije v pripravljenih raztopinah realnih vzorcev so bile prenizke glede na LOD in LOQ. Da bi lahko vrednotili tudi vsebnost vitaminov B7 in B12, smo poskusili s koncentriranjem raztopine pripravka D (poglavje 3.3.2.12). Po eno tableto smo raztopili v 25 mL topila, a vitaminov B7 in B12 nismo zaznali. Teoretični izračun na podlagi umeritvenih premic in preračunanih LOQ je pokazal, da bi bilo treba eno tableto pripravka D raztopiti v 9 mL topila, da bi bila kromatografska vrhova vitaminov B7 in B12 nad vrednostjo LOQ. V praksi to ni možno, ker se v tako majhnem volumnu tekočine tableta ne bi popolnoma raztopila. Zaznava vitamina B12 bi bila glede na deklarirane količine teoretično mogoča pri pripravku H, vendar kromatografski vrh ni bil jasno razločljiv glede na šum bazne linije (poglavje 4.3.2). Da bi lahko vrednotili vsebnost tudi teh dveh vitaminov, bi morali vpeljati bolj občutljiv način detekcije – sklopiti HPLC z masnim spektrometrom – in skladno prilagoditi pripravo vzorcev.

4.3.5 KEMIJSKE OBLIKE VITAMINOV

Vitamini B kompleksa se pojavljajo v različnih kemijskih oblikah, kar je potrebno upoštevati pri izračunu vsebnosti. Razlike so med posameznimi pripravki ter med pripravki in standardom. Kjer je bil standard vitamina v drugačni obliki kot v pripravku, smo koncentracijo preračunali sorazmerno z razmerjem molekulskih mas (poglavje 3.5.4). Takšen primer je bil vitamin B1, ki je v standardu v obliki soli s kloridom ($M = 337,263 \text{ g/mol}$), v pripravkih pa se nahaja v obliki soli z nitratom ($M = 327,359 \text{ g/mol}$) ali kloridom.

Ime vitamin B5 lahko predstavlja tri kemijske oblike (dekspantenol, pantotensko kislino in pantotenat), kot je opisano v poglavju 1.1.4. Vsi pripravki (od A do H) imajo deklarirano obliko kalcijev pantotenat. Vendar če dobljene koncentracije preračunamo na molekulsko maso kalcijevega pantotenata, dobimo vsebnost okoli 200 %. Ker je M kalcijeve soli približno dvakratnik M dekspantenola, smo sklepali, da v pripravkih ni kalcijevega pantotenata, ampak dekspantenol oz. je deklarirana masa podana za dekspantenol, izdelek pa vsebuje kalcijevo sol. V preglednici XIX je navedena ugotovljena masa vitamina B5, ki smo jo dobili na podlagi izračunov za dekspantenol. Pantotenska kislina se zaradi higroskopskih lastnosti redko uporablja [4].

Pri pregledu ovojnine, izvedenemu z namenom pridobivanja podatkov o deklariranih količinah in kemijskih oblikah, smo opazili nekaj neskladnosti. Pripravek H ima etiketo v slovenskem in angleškem jeziku. Prva navaja pantotensko kislino, druga pa kalcijev pantotenat ob enaki masi vitamina. Pri pripravku E so vitamini B1, B2, B6 in B12 napisani samo s kraticami in kemijske oblike sploh niso opredeljene. Vitamini B2, B6 in B12 imajo v vseh pregledanih trdnih pripravkih (preglednici I in II) isto obliko in to so tudi kemijske oblike standardov, ki smo jih uporabljali za pripravo referenčnih raztopin, zato smo vsebnost izračunali na podlagi M uporabljenih standardov. Vitamin B1 je lahko v dveh različnih oblikah. Pri izračunih za pripravek E smo upoštevali M tiaminijevega klorida, kot je označeno v preglednici XIX. Obstaja pa verjetnost, da dobljeni rezultati niso točni, čeprav je ugotovljena masa primerljiva z deklarirano.

4.3.6 ZDRAVILA IN PREHRANSKA DOPOLNILA

Rezultati vrednotenja vsebnosti se pri zdravilih (pripravki A–C) in prehranskih dopolnilih (pripravki D–H) bistveno ne razlikujejo. Pri pripravkih A in B so ponovljivosti bolj konsistentne kot pri ostalih pripravkih in izkoristek je nad postavljeno mejo pri vseh

vitaminih. Pri obeh smo izmerili preveliko vsebnost vitamina B9. Vse vsebnosti so znotraj farmakopejskih kriterijev pri pripravkih C, D in E. Največ neujemanj rezultatov s kriteriji vsebnosti pa je pri pripravkih F in G.

Zdravila imajo veliko bolj urejeno označevanje sestave, čeprav tudi pri pripravkih A, B in C ne vemo, katero obliko vitamina B5 vsebujejo. Pri nekaterih prehranskih dopolnilih pa smo zasledili neskladnosti pri označevanju ovojnine (opredelitev kemijskih oblik, neustreznost prevodov).

5 SKLEP

- ❖ Razvili in optimizirali smo enostavno analizo metodo HPLC za sočasno vrednotenje osmih vitaminov B kompleksa:
 - Analiti so se ustrezno ločili pri gradientnem programu s 13 % ACN in pretokom mobilne faze 1 mL/min. Čas analize je bil 18 min.
 - Vitamine B1, B2, B3, B6 in B9 smo detektirali pri valovni dolžini 280 nm, vitamine B5, B7 in B12 pa pri 210 nm.
 - Analizno metodo smo validirali v skladu s smernicami ICH za vrednotenje analiznih metod in potrdili ustreznost metode za naš namen.
- ❖ Pripravili smo dve raztopini standardov vitaminov B kompleksa, ki sta nam služili kot referenčni raztopini:
 - Koncentracije vitaminov B kompleksa v raztopinah standardov so bile v enakem razmerju kot deklarirane količine vitaminov v pripravkih.
 - Primerno topnost in stabilnost vitaminov B2 in B9 v želenih koncentracijah smo zagotovili z raztopitvijo standardov vitaminov v eni desetini 0,01 M NaOH in nato raztopini uravnali pH z dodatkom 100 mM fosfatnega pufru s pH 7.
 - Ugotovili smo, da sta standarda vitaminov B2 in B9 delno topna tudi v MeOH.
- ❖ Na vzorčnem pripravku D smo razvili postopek priprave realnih vzorcev:
 - Eno tableto pripravka smo raztopili v 100 mL fosfatnega pufru s pH 7 in ekstrakcijo vitaminov pospešili z 10 min uporabo ultrazvoka.
 - Da so bili vzorci primerni za analizo s sistemom HPLC, smo jih po razpadu tablete centrifugirali 10 min pri 13.000 obratih na temperaturi 20 °C.
 - Meritve vsebnosti vitaminov B kompleksa v različnih volumnih topila so bile med seboj primerljive. Izjema je vitamin B9 v volumnih manjših od 100 mL.
- ❖ Postopek priprave realnih vzorcev smo optimizirali in na vzorcih različnih pripravkov metodo dodatno vrednotili:
 - Postopek priprave realnih vzorcev, razvit na pripravku D, smo optimizirali za posamezen pripravek, vključen v študijo.
 - Ponovljivost priprave znotraj tablete in med različnimi tabletami enega pripravka je bila ustrezna glede na kriterije, ki smo si jih postavili.
 - Pri večini pripravkov je bila ponovljivost znotraj tablete boljša kot med različnimi tabletami, zaradi česar lahko sklepamo, da je razvita metoda primerna za vrednotenje vsebnosti vitaminov B kompleksa v pripravkih.

- Izkoristki ekstrakcije so ustrezali mejam sprejemljivosti, ki smo si jih postavili.
- Vsebnost vitamina B3 v pripravkih smo vrednotili na podlagi višine kromatografskih vrhov, vsebnost ostalih vitaminov B kompleksa pa na podlagi površine pod krivuljo kromatografskega vrha.
- ❖ Vrednotenje vsebnosti vitaminov B kompleksa v izbranih pripravkih:
 - Rezultat vrednotenja vsebnosti smo podali za kemijsko obliko vitamina, ki je bila navedena na ovojnini pripravka.
 - Vsebnost vitaminov B kompleksa je bila pri večini pripravkov v okviru farmakopejskih kriterijev vsebnosti.
 - V nekaj primerih rezultati vrednotenja vsebnosti niso kredibilni, saj je bila v pripravljenem vzorcu koncentracija vitamina nad mejo topnosti.
 - Zaradi prenizkih vsebnosti nismo v nobenem pripravku, ki smo ga testirali, zaznali vitamina B7 in B12. Glede na deklarirane količine bi bila teoretično možna detekcija v pripravku H, vendar kromatografskih vrhov vitamina B7 in B12 nismo zaznali.
 - Da bi zaznali kromatografska vrhova vitamina B7 in B12 bi morali eno tableto vzorčnega pripravka D raztopiti v 9 mL topila, kar pa v praksi ni možno. Vitamina bi sicer lahko zaznali z bolj občutljivim načinom detekcije (npr. masni spektrometer).
 - Ugotovili smo, da med zdravili in prehranskimi dopolnili ni večjih razlik v vsebnosti vitaminov B kompleksa.
- ❖ Pri pregledu ovojnine smo ugotovili, da so kemijske oblike vitaminov lahko različne v posameznih pripravkih ter med pripravki in standardi:
 - Vitamin B1 je v standardu in v nekaterih izbranih pripravkih v obliki soli s kloridom, v drugih pa v obliki nitrata.
 - Vsi pripravki, ki so bili vključeni v študijo, imajo za vitamin B5 deklarirano kemijsko obliko kalcijev pantotenat, vendar se rezultati vrednotenja vsebnosti bolj ujemajo za obliko dekspantenol, kar smo tudi upoštevali pri naših izračunih.
 - Pri prehranskih dopolnilih smo opazili nekaj neskladnosti pri označevanju sestave (neopredeljene kemijske oblike vitaminov, neustreznost prevodov).

6 LITERATURA

1. Kennedy DO: B Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy—A Review. *Nutrients* 2016; 8(2).
2. Taguchi K, Fukusaki E, Bamba T: Simultaneous analysis for water- and fat-soluble vitamins by novel single chromatography technique unifying supercritical fluid chromatography and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2014; 1362: 270–7.
3. Heudi O, Kiliç T, Fontannaz P: Separation of water-soluble vitamins by reversed-phased high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: Application to polyvitaminated premixes. *Journal of Chromatography A* 2005; 1070: 49–56.
4. Jedlička A, Klimeš J: Determination of Water- and Fat-Soluble Vitamins in Different Matrices Using High-Performance Liquid Chromatography. *Chemical Papers* 2005; 59(3): 202–22.
5. Vidović S, Stojanović B, Veljković J, Pražić-Arsić L, Roglić G, Manojlović D: Simultaneous determination of some water-soluble vitamins and preservatives in multivitamin syrup by validated stability-indicating high performance liquid chromatography method. *Journal of Chromatography A* 2008; 1202: 155–62.
6. Foye WO, Lemke TL, Williams DA: Principles of medicinal chemistry, 4th edition, Lippincott Williams & Wilkins, 1995; 652–87.
7. Rucker RB, Suttie JW, McCormick DB, Machlin LJ: Handbook of Vitamins, 3rd edition, Marcel Dekker, New York, 2001.
8. Schellack G, Harirari P, Schellack N: B-complex vitamin deficiency and supplementation. *South African Pharmaceutical Journal* 2015; 82(4): 28–7.
9. Eitenmiller RR, Ye I, Landen Jr WO: Vitamin analysis for the health and food sciences, 2nd edition, CRC Press, 2008.
10. Medić-Šarić M, Buhač I, Bradamante V: Vitamini in minerali, resnice in pedsodki, In *obs medicus*, Ptuj, 2002.
11. Li K: Simultaneous determination of nicotinamide, pyridoxine hydrochloride, thiamine mononitrate and riboflavin in multivitamin with minerals tablets by reversed-phased ion-pair high performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography* 2002; 16: 504–7.
12. Zakon o zdravilih (ZZdr-2), 2014, Uradni list Republike Slovenije, 2014/17: 1787–2040.
13. Direktiva 2002/46/ES Evropskega parlamenta in sveta o približevanju zakonodaj držav članic o prehranskih dopolnilih, 2002, Uradni list Evropske unije, 183/51: 490–7.
14. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Milgamma 100 mg/100 mg obložene tablete, 26-9-2016.
15. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Pikovit obložene tablete, 25-7-2016.
16. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Pikovit forte obložene tablete, 29-7-2016.
17. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Pikovit sirup, 27-7-2016.
18. Povzetek glavnih značilnosti zdravila B-complex obložene tablete, 2-6-2016.
19. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Elevit Pronatal filmsko obložene tablete, 20-2-2015.
20. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Folacin 5 mg tablete, 11-7-2012.
21. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Tifol 0,4 mg filmsko obložene tablete, 31-5-2017.

22. The United States Pharmacopeia 2016, USP 39; The National Formulary, NF 34, Volume 4, United Book Press, Baltimore, 2015: 6927–7112.
23. Markopoulou CK, Kagkadis KA, Koundourellis JE: An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B1, B6, B12 in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002; 30: 1403–10.
24. Chen P, Wolf WR: LC/UV/MS-MRM for the simultaneous determination of water-soluble vitamins in multi-vitamin dietary supplements. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 2007; 387: 2441–8.
25. Fotsing L, Fillet M, Bechet I, Hubert P, Crommen J: Determination of six water-soluble vitamins in a pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1997; 15: 1113–23.
26. Monferrer-Pons L, Capella-Peiro ME, Gil-Agustí M, Esteve-Romero J: Micellar liquid chromatography determination of B vitamins with direct injection and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A* 2003; 984: 223–31.
27. Moreno P, Salvado V: Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2000; 870: 207–15.
28. Ivanović D, Popović A, Radulović D, Medenica M: Reversed-phased ion-pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1999; 18: 999–1004.
29. ICH: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf. Dostop: 25-6-2017.
30. DrugBank: <https://www.drugbank.ca/>. Dostop: 26-8-2017.
31. The Merck Index, 13th edition, Merck & Co., New Jersey, 2001: 748.
32. Martindale: The Extra Pharmacopoeia, 38th edition, London, The Pharmaceutical Press, 2014; 1456.
33. The PubChem Project: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31404#section=Top>. Dostop: 26-8-2017.