



UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE HOLEKALCIFEROLA V VZORCIH KOMERCIALNIH PREHRANSKIH DOPOLNIL

RAZISKOVALNA NALOGA

Področje:
FARMACIJA

Avtorica: Ana Krošl, 3. letnik

Mentorici: mag. Lea Jusufović Glažar, prof.,
Tjaša Drolc, mag.

Mestna občina Celje, Mladi za Celje

Celje, 2025

Kazalo vsebine

1	Uvod.....	7
1.1	Namen raziskovalnega dela.....	7
1.2	Metode dela	7
1.2.1	HPLC metoda	8
1.2.2	Razlika med zdravilom in prehranskim dopolnilom	9
1.3	Hipoteze.....	10
2	Teoretični del.....	11
2.1	Splošno o vitaminu D	11
2.2	Vnos vitamina D in biosinteza v človeškem telesu	12
2.3	Vloga vitamina D v našem telesu	13
2.3.1	Fiziološka vloga vitamina D.....	13
2.3.2	Posledice pomanjkanja vitamina D	14
2.3.3	Posledice prevelikega vnosa vitamina D.....	15
2.4	Dosedanje raziskave prehranskih dopolnil z vitaminom D ₃	15
3	Eksperimentalni del	16
3.1	Opis dela.....	16
3.1.1	Uporabljene kemikalije	17
3.1.2	Merilni instrumenti	17
3.1.3	Laboratorijski inventar	17
3.1.4	Priprava osnovnih raztopin.....	18
3.1.5	Priprava raztopin izbranih vzorcev	19
3.1.6	Priprava raztopin za umeritveno krivuljo	20
3.1.7	Priprava vzorcev za HPLC-analizo	20
3.1.8	Meritev s HPLC-sistemom	21
3.2	Meritve in rezultati	22
3.2.1	Umeritvena krivulja	22

3.2.2	Vzorci.....	23
3.3	Diskusija.....	25
4	Zaključek	27
5	Viri in literatura	28
6	Priloge	30
6.1	Primer izračuna koncentracije vitamina D ₃ na osnovi umeritvene krivulje (vzorec sp001-1, povprečna meritev).....	30
6.2	Kromatogram standarda vitamina D ₃ pri koncentraciji pribl. 63 mg/L pri izbranih kromatografskih pogojih	31
6.3	Kromatogram vzorca sp001	32
6.4	Kromatogram vzorca sp002	33
6.5	Kromatogram vzorca sp003	34
6.6	Kromatogram vzorca sp004	35
6.7	Kromatogram vzorca sp005	36
6.8	Sekvenca	37

Kazalo slik

Slika 1:	Shema HPLC sistema	8
Slika 2:	Primer HPLC kromatograma.....	9
Slika 3:	Primerjava strukture ergo- in holekalciferola.....	11
Slika 4:	Osnovna raztopina standarda vitamina D ₃ (holekalciferol)	18
Slika 5:	Primer prebadanja kapsule	19
Slika 6:	Primer tehtanja vzorca.....	19
Slika 7:	Primer dodajanja metanola	19
Slika 8:	Primer stresanja.....	19
Slika 9:	Ultrazvočna kopel	20
Slika 10:	Centrifugiranje	20
Slika 11:	Filtriranje	20
Slika 12:	Priprava raztopin za umeritveno krivuljo	20

Kazalo tabel

Tabela 1: Zgornja meja za dnevni vnos vitamina D glede na starost	15
Tabela 2: Podatki o analiziranih vzorcih	16
Tabela 3: Podatki o uporabljenih kemikalijah	17
Tabela 4: Kromatografski pogoji za merjenje vitamina D ₃	21
Tabela 5: Meritve kalibracijskih raztopin.....	22
Tabela 6: Rezultati izmerjenih površin vrhov vitamina D ₃ pri posameznih vzorcih	23
Tabela 7: Končni rezultati	23
Tabela 8: Izračunana odstopanja od deklariranih vrednosti	24
Tabela 9: Primerjava odstopanj vrednosti holekalciferola in cen	26

Kazalo grafikonov

Grafikon 1: Povprečna površina vrha z znanimi koncentracijami standarda vitamina D ₃ znotraj linearnega območja	22
--	----

Zahvala

Zahvaljujem se podjetju Acies Bio d.o.o., ki mi je omogočilo laboratorijsko delo, in somentorici, Tjaši Drolc, mag., ki mi je pomagala pri izvedbi testiranja in pri reševanju vseh nejasnosti.

Zahvaljujem se profesorici slovenskega jezika, Ireni Robič Selič, za lektoriranje naloge, ter svoji šoli, I. gimnaziji v Celju, za podporo in izobraževanje na področju raziskovalnega dela.

Največja zahvala velja moji mentorici, mag. Lei Jusufović Glažar, ki me je pri raziskovanju podpirala, mi svetovala ter bila pripravljena pomagati pri morebitnih nejasnostih.

Povzetek

Vitamin D₃ (holekalciferol) je eden izmed ključnih vitaminov za naše telo. Zaradi velike ponudbe različnih prehranskih dopolnil v prosti prodaji in zanje ohlapne zakonodaje me je zanimalo, kakšna so odstopanja med deklarirano in dejansko vrednostjo vitamina D₃ v prehranskih dopolnilih, dostopnih slovenskim potrošnikom. Kot analizno metodo sem uporabila tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Odstopanja od deklarirane vrednosti sem primerjala s ceno in z mesti nakupa posameznih prehranskih dopolnil.

Ugotovila sem, da dva od štirih testiranih vzorcev prehranskih dopolnil nista ustrezala označbam na svojih deklaracijah, med drugim tudi en vzorec prehranskega dopolnila iz lekarne, pri katerem tovrstnih odstopanj nisem pričakovala. Neustrezno deklariran je bil tudi izdelek, kupljen preko spleta, pri katerem sem ugotovila izrazito odstopanje od navedene vrednosti. Ustrezno deklarirana sta bila drugo prehransko dopolnilo iz lekarne in prehransko dopolnilo, kupljeno v trgovini. Glede na ceno sem ugotovila, da so dražja prehranska dopolnila načeloma kvalitetnejša.

Ključne besede: prehranska dopolnila, holekalciferol, tekočinska kromatografija

Abstract

Vitamin D₃ (cholecalciferol) is one of the key vitamins for our body. Due to the wide availability of various dietary supplements on the market and the relatively loose regulations regarding them, I was interested in the discrepancies between the declared and actual values of vitamin D₃ in dietary supplements available to Slovenian consumers. As an analytical method, I used high-performance liquid chromatography (HPLC). I compared deviations from the declared value with the price and the place of purchase of individual dietary supplements.

I found that two out of four samples of dietary supplements I tested did not comply with the labels on their packaging. This included one dietary supplement purchased from a pharmacy, where I did not expect such discrepancies. A product bought online was also incorrectly labelled, showing a significant deviation from the declared value. The other dietary supplement from a pharmacy and the one purchased in a store were accurately labelled. Regarding price, I found that more expensive dietary supplements generally tended to be of higher quality.

Keywords: dietary supplements, cholecalciferol, liquid chromatography

1 Uvod

1.1 Namen raziskovalnega dela

V raziskovalni nalogi sem se ukvarjala z vprašanjem kakovosti prehranskih dopolnil, dostopnih slovenskim potrošnikom. Raziskave namreč kažejo, da v zimskem delu leta kar 80 % Slovenk in Slovencev primanjkuje vitamina D, pri čemer pomanjkanje ni obšlo niti tistih, ki so redno uživali prehranska dopolnila (1). Tako se pojavlja vprašanje o morebitnih nepravilnostih pri proizvodnji in deklaraciji tovrstnih izdelkov, ki sem se ga odločila raziskati.

Glavni obliki vitamina D v človeškem telesu sta vitamin D₂ oz. ergokalciferol in vitamin D₃ oz. holekalciferol, ki imata enak način delovanja, presnove in izločanja (2). Razlikujeta se v tem, da holekalciferol telo bolje izkoristi, njegovi učinki pa trajajo dlje časa kot pri ergokalciferolu (3), kar je poleg pogostejšega pojavljanja tovrstnih prehranskih dopolnil na trgu vplivalo na mojo odločitev za analizo izdelkov s holekalciferolom.

1.2 Metode dela

Obstaja več analiznih metod za kvantitativno določanje vitamina D₃. Sama sem uporabila tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), ki se med drugim uporablja za določanje vitamina D₃ v študijah stabilnosti ter v raztopinah, prehranskih dopolnilih in farmacevtskih izdelkih (4). Metodo, opisano v članku, sem s prilagoditvami glede količine analita, vrste detektorja in števila obratov pri centrifugiranju vzela za osnovo določanja koncentracije vitamina D₃.

Poleg testiranja vzorcev prehranskih dopolnil sem izvedla tudi analizo vzorca farmacevtskega izdelka oziroma zdravila. To sem uporabila kot kontrolo svoje metode, saj bi v primeru večjih odstopanj lahko ugotovila, ali je šlo za odstopanja prehranskih dopolnil ali je k večjemu deležu odstopanj pripomogla tudi moja napaka. Do te bi namreč lahko prišlo zaradi morebitne uporabe različne analitske metode od tistih, ki jih uporabljajo posamezna podjetja. Za kontrolo sem izbrala zdravilo s slovenskega trga, na katerem sem lahko uporabila enako metodo kot na vzorcih prehranskih dopolnil, zaupala pa sem mu zaradi z zakonodajo urejene proizvodnje, ki zahteva natančno navajanje zdravilne učinkovine.

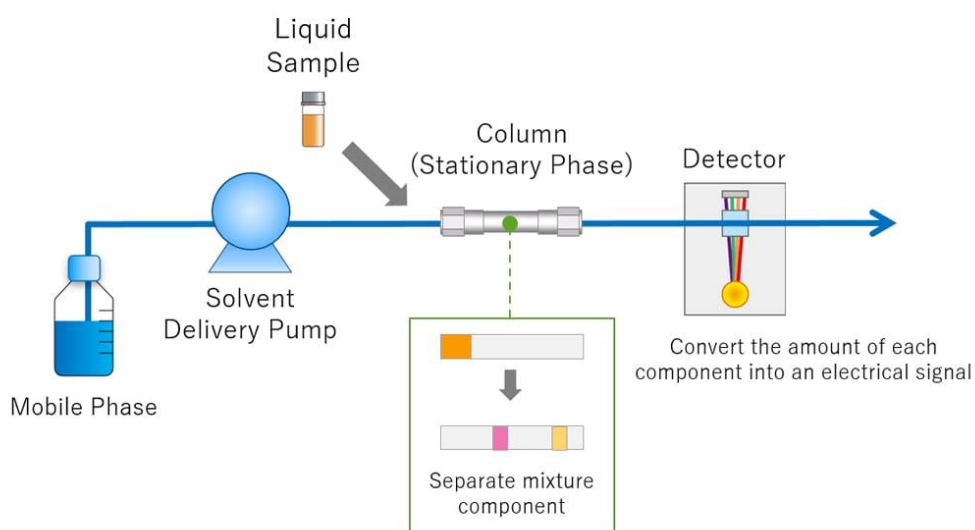
1.2.1 HPLC metoda

HPLC oz. tekočinska kromatografija visoke ločljivosti je analitska tehnika v kemiji, ki se uporablja za ločevanje spojin v kemijskih zmesih. Temelji na pretoku mobilne faze pod pritiskom skozi kolono, napolnjeno s stacionarno fazo (5).

Glavni sestavni deli HPLC sistema, ki je prikazan na sliki 1, so:

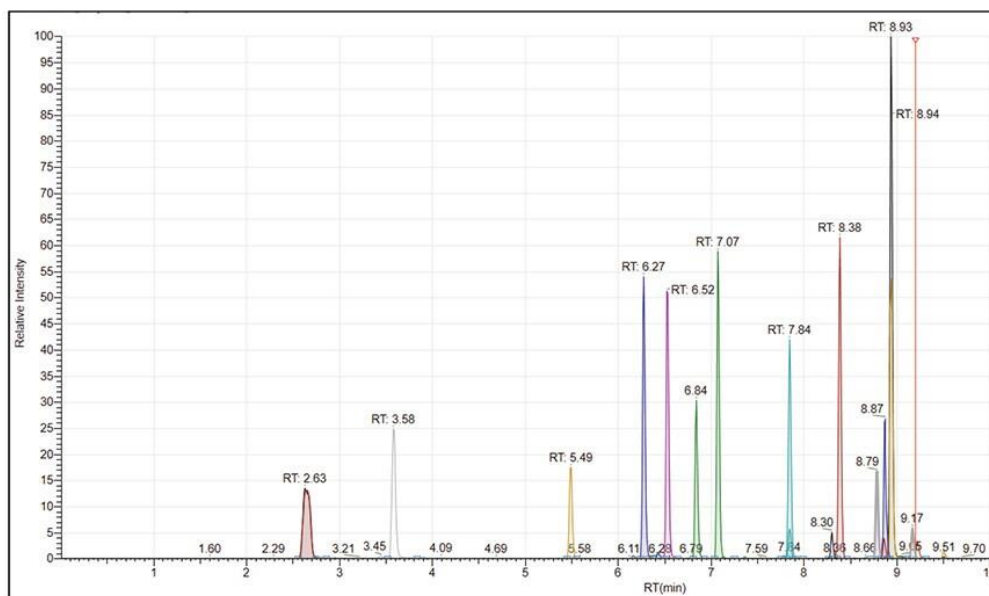
- črpalka ("Solvent Delivery Pump"), ki poganja mobilno fazo skozi sistem;
- kolona ("Column") s stacionarno fazo, kjer pride do ločevanja spojin v vzorcu;
- detektor ("Detector"), ki zazna spojine po njihovem izluževanju iz kolone in
- kromatografski podatkovni sistem, ki upravlja napravo, ločevanje, zaznavanje in vrednotenje rezultatov (5).

Črpalko, kolono in detektor povezujejo cevi in povezovalne kapilare, ki omogočajo stalen pretok mobilne faze in vzorca skozi sistem (5).



Slika 1: Shema HPLC sistema (14)

Tekoča mobilna faza prenaša vzorec skozi kolono do detektorja, pri čemer se spojine oziroma analiti ločijo zaradi različno močnih interakcij s stacionarno fazo. Detektor analite zazna po njihovem izluževanju iz kolone, nato pa kromatografski podatkovni sistem pretvori zaznani signal. Rezultat analize s HPLC-jem je kromatogram, kjer je os x merilo za čas, os y pa prikazuje specifičen signal, ki ga generira detektor (5). Primer kromatograma je prikazan na sliki 2.



Slika 2: Primer HPLC kromatograma (5)

1.2.2 Razlika med zdravilom in prehranskim dopolnilom

Zdravilo je vsaka snov ali kombinacija snovi, ki so predstavljene z lastnostmi za zdravljenje ali preprečevanje bolezni pri ljudeh ali živalih. (6)

Prehranska dopolnila so živila, katerih namen je dopolnjevati običajno prehrano. So koncentrirani viri posameznih ali kombiniranih hranil ali drugih snovi s hranilnim ali fiziološkim učinkom, ki se dajejo v promet v farmacevtskih oblikah (tabletah, kapsulah, pastilah, vrečkah s praškom, ampulah s tekočino, kapalnih stekleničkah itd.), tako da se jih lahko uživa v odmerjenih majhnih količinskih enotah. Kljub temu da so v farmacevtskih oblikah, značilnih za zdravila, niso namenjena preprečevanju in zdravljenju bolezni in bolezenskih stanj. Sestavine prehranskih dopolnil se lahko razvrščajo med nova živila. (6)

1.3 Hipoteze

Pred začetkom raziskovalnega dela sem postavila naslednje hipoteze:

1. Prehransko dopolnilo, ki je kupljeno v lekarni, ima na deklaraciji točno zapisano koncentracijo holekalciferola.
2. Prehransko dopolnilo, ki je kupljeno preko spleta ali v trgovini, na deklaraciji nima točno zapisane koncentracije holekalciferola.
3. Nižja, kot je cena prehranskega dopolnila, večja so odstopanja dejanske koncentracije vitamina D₃ od zapisane vrednosti na deklaraciji.

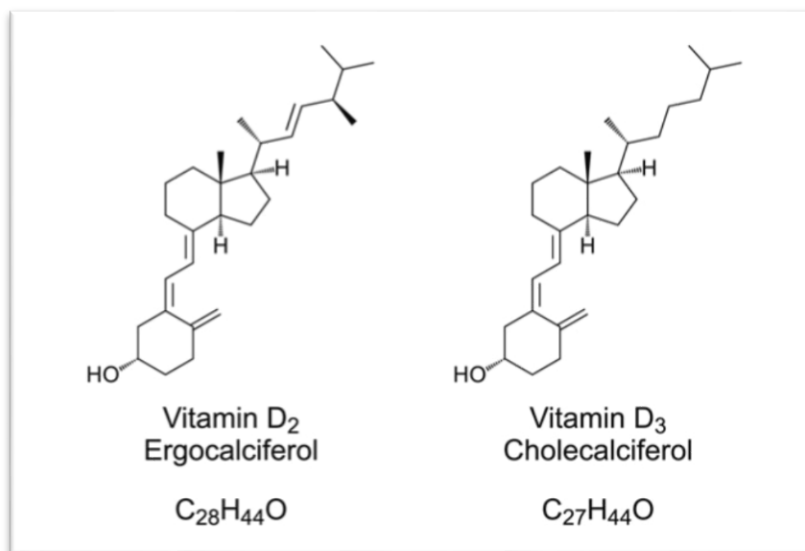
2 Teoretični del

2.1 Splošno o vitaminu D

Vitamini so organske snovi, ki jih v prehrani potrebujemo v majhnih količinah in imajo različne naloge. Za ljudi je esencialnih 13 vitaminov. Razvrščamo jih na vitamine, topne v vodi, in na vitamine, topne v maščobah (7).

Vitamin D spada med maščobotopne vitamine, vendar ga zaradi načina delovanja in možnosti nastajanja tudi v telesu uvrščamo med prohormone. Gre za skupino sekosteroidov s kalciotropnim delovanjem, katerih glavna naloga je uravnavanje nivoja kalcija in fosfatov v krvi. (2)

Glavni obliki vitamina D sta ergokalciferol (vitamin D₂), ki ga v telo vnašamo z rastlinsko hrano, in holekalciferol (vitamin D₃), ki ga lahko sami sintetiziramo v koži ali ga vnašamo s hrano živalskega izvora. Poleg holekalciferola in ergokalciferola se v našem organizmu nahajajo številni presnovki vitamina D, ki so praviloma tudi biološko aktivnejši (2).



Slika 3: Primerjava strukture ergo- in holekalciferola (13)

Slika 3 prikazuje primerjavo glavnih oblik vitamina D. Pri ergokalciferolu opazimo dodatno metilno skupino in dvojno vez.

Obliki vitamina D se po jakosti delovanja in farmakokinetičnih lastnostih nekoliko razlikujeta, ob tem pa so njune farmakodinamske lastnosti in s tem način delovanja ter način presnove in izločanja enaki. Teh oblik zato fiziološko ne ločujemo in jih zaobjamemo s skupnim izrazom vitamin D. (2)

2.2 Vnos vitamina D in biosinteza v človeškem telesu

Človeško telo vitamin D prejme iz zaužite hrane in s procesom biosinteze, zato so prehranske potrebe po tem vitaminu odvisne tudi od količine biosintetiziranega (endogenega) vitamina D. Po najnovejših priporočilih bi v popolni odsotnosti biosinteze človeško telo dnevno potrebovalo 20 µg (800 I. E.¹) vitamina D (8).

Hrane, ki naravno vsebuje vitamin D, je malo, saj mlečni izdelki, sadje in zelenjava vitamina D praktično ne vsebujejo. Velike količine tega vitamina so v ribjem olju in olju ribjih jeter, gobah, manjše količine pa najdemo npr. v govejih jetrih, sirih in rumenjaku. Količina vitamina D v mesu se zelo spreminja in je odvisna od vitamina D v živalski krmi. Upoštevati je treba, da tudi priprava hrane vpliva na vsebnost vitamina D, tako lahko kuhanje in cvrtje znižata vrednost za 20–40 % (2).

Glavni vir vitamina D pri večini ljudi predstavlja endogena sinteza vitamina D v koži. (8) Gre za sintezo vitamina D₃, holekalciferola, ki nastane iz 7-dehidroholesterola pod vplivom UVB-sevanja (sončni žarki, LED-svetilke ipd.). Ob tem lahko nastajajo tudi številne fotoizomerne oblike holekalciferola, ki niso biološko aktivne in tako preprečujejo hipervitaminozo D. Intenzivnost te sinteze je zelo odvisna od količine UVB-žarkov in se zato zelo spreminja z letnim časom in geografsko širino (2). Tako je lahko v tropskih območjih za biosintezo vitamina D izpostavljenost soncu zadostna čez celo leto, na nekaterih geografskih območjih, kot je npr. severna Evropa, pa zaradi nizke intenzitete UVB-žarkov ta predstavlja pereč problem (8). V Sloveniji je najizrazitejše pomanjkanje vitamina D v zimskih mesecih oziroma od novembra do aprila, kar je bilo ugotovljeno pri 80 % prebivalstva, vključno s tistimi, ki so redno jemali prehranska dopolnila, pri čemer se postavlja vprašanje o doslednem uživanju in kvaliteti uporabljenih prehranskih dopolnil (1).

¹ Enota I. E. (iz mednarodne enote) je mednarodna enota za izražanje količine v maščobi topnih vitaminov. 1 enota I. E. izraža različno masno enoto za vsak vitamin (za vitamin D: 1 I. E. = 0,025 µg).

2.3 Vloga vitamina D v našem telesu

2.3.1 Fiziološka vloga vitamina D

Vitamin D je odgovoren za uravnavanje nivoja kalcija v krvi in tkivih. Skupaj z drugima dvema kalciotropnima hormonoma (paratiroidnim hormonom in kalcitoninom) uravnava absorpcijo kalcija iz hrane, reabsorpcijo iz seča in njegovo shranjevanje v kostnem tkivu. Vitamin D torej deluje v vseh glavnih organih, ki so ključni za uravnavanje koncentracije kalcija v krvi, in sicer v tankem črevesju, ledvicah in kosteh (2).

Vitamin D je skupaj s kalcijem pri dojenčkih in malčkih pomemben pri razvoju in izgradnji kosti ter zob, pri odraslih pa preprečuje oslabitev in zmeščanje kosti. Poudariti je treba, da je pomembna vloga vitamina D za ohranjanje zdravih kosti izpolnjena le, če je poleg ustrezne preskrbljenosti z vitaminom D zagotovljen tudi zadosten vnos kalcija. Vitamin D ugodno vpliva tudi na živčno-mišične funkcije, vnetja in izražanje številnih genov. (9)

2.3.1.1 Vitamin D in respiratorne bolezni

Nizke serumske koncentracije vitamina D so povezane z večjim tveganjem za okužbe in okvare dihal, kot so pljučnica, bronhitis, gripa, akutni respiratorni distresni sindrom (ARDS¹⁰), sepsa in smrt zaradi pljučnih vnetij. To spoznanje je privedlo do hipoteze, da je lahko nizka raven vitamina D povezana z večjim tveganjem za okužbo s COVID-19 in resnostjo poteka bolezni. Obsežna metaanaliza, ki je vključevala 10.000 preiskovancev, je pokazala, da je dodajanje vitamina D zmanjšalo tveganje za pojav akutnih okužb dihal pri vseh preiskovancih. 1,25(OH)₂D, aktivna hormonska oblika vitamina D, ima pomembno vlogo tudi v pljučih, saj s protivnetnim delovanjem preprečuje številne okužbe. Številni pozitivni učinki nadomeščanja vitamina D so se pokazali pri bolnikih z astmo in pri preprečevanju okužb dihal, še posebej pri pacientih s hudim pomanjkanjem vitamina D. (10)

2.3.2 Posledice pomanjkanja vitamina D

Pomanjkanje vitamina D povzroča zmanjšanje serumske koncentracije kalcija in fosforja, kar vodi v motnje pri mineralizaciji kosti. Klinični simptomi pomanjkanja vitamina D se pri dojenčkih in otrocih odražajo kot rahitis, ki se kaže predvsem v deformacijah kosti, nepravilnem razvoju skeleta, kosti postanejo šibke in se lahko upognejo, na rastnih hrustancih se pojavijo odebelitve in izrastline, lahko pride do razvojnih okvar in pojava hipokalcemije, zmanjšane mišične moči in mišičnega tonusa. Pri odraslih pomanjkanje vitamina D vodi v osteomalacijo, pojav bolezni »mehkih kosti« zaradi napredovane dekalifikacije kosti. Pojavi se večje tveganje za zlom kosti, za bolečine v kosteh in mišicah ter za mišično oslabelost. Bolezen lahko pozneje vodi v zmanjšanje kostne gostote in nastanek osteoporoze v starosti. Tako pri rahitisu kot pri osteomalaciji se lahko pojavijo tudi zaostanek v razvoju, tetanični krči, okvara srčne mišice in nepravilnosti zob. (10)

Večje tveganje za pomanjkanje vitamina D imajo:

- dojenčki, ki so dojeni, saj materino mleko pogosto ne vsebuje zadostne količine vitamina D,
- starejši ljudje, saj se s starostjo zmanjša sposobnost kože za tvorbo vitamina D ob izpostavljenosti sončni svetlobi,
- ljudje, ki redko izpostavljajo kožo sončni svetlobi zaradi pomanjkanja zunanje aktivnosti ali pokrivanja telesa in glave,
- ljudje s temnejšo kožo, saj ta manj učinkovito proizvaja vitamin D ob izpostavljenosti soncu (3).

Več vitamina D potrebujejo tudi ljudje z bolezenskimi stanji, ki omejujejo absorpcijo maščob (Crohnova bolezen, celiakija ali ulcerozni kolitis), z debelostjo ali tisti, ki so prestali operacijo želodčnega obvoda (3).

2.3.3 Posledice prevelikega vnosa vitamina D

Prevelika serumska koncentracija vitamina D (več kot 150 ng/mL krvi) lahko povzroča slabost, bruhanje, mišično oslabeledost, zmedenost, bolečine, izgubo apetita, dehidracijo, pretirano uriniranje in žejo ter ledvične kamne. V skrajnih primerih lahko povzroči tudi odpoved ledvic, nepravilen srčni utrip ali celo smrt (3).

Pri procesu biosinteze vitamina D koža sama uravnava nastajanje vitamina D, zato v tem primeru hipervitaminoza D ni možna. Največkrat so visoke ravni vitamina D posledica prekomernega uživanja tovrstnih prehranskih dopolnil (3).

Tabela 1: Zgornja meja za dnevni vnos vitamina D glede na starost (3)

Starost	Zgornja meja za dnevni vnos vitamina D
0–6 mesecev	25 µg (1,000 I. E.)
7–12 mesecev	38 µg (1,500 I. E.)
1–3 let	63 µg (2,500 I. E.)
4–8 let	75 µg (3,000 I. E.)
9–18 let	100 µg (4,000 I. E.)
19+ let	100 µg (4,000 I. E.)
Nosečnice in doječe ženske	100 µg (4,000 I. E.)

V tabeli so navedene zgornje dnevne meje za vnos vitamina D, ki vključujejo vnos iz vseh virov – hrane, pijač in prehranskih dopolnil. V določenih primerih pomanjkanja lahko zdravnik za namene zdravljenja priporoči višje odmerke od priporočenih (3).

2.4 Dosedanje raziskave prehranskih dopolnil z vitaminom D₃

Pred začetkom dela sem se pozanimala o že obstoječih raziskavah prehranskih dopolnil z vitaminom D in našla analizo prehranskih dopolnil, dostopnih slovenskim potrošnikom, ki je bila objavljena v reviji Zveze potrošnikov Slovenije. Ta raziskava se je osredotočala na dopolnila v obliki kapsul, kapljic in pršil, nisem pa zasledila prehranskih dopolnil v obliki tablet (11), zato sem se sama odločila raziskati tudi te.

3 Eksperimentalni del

3.1 Opis dela

Analizirala sem tablete oziroma kapsule štirih prehranskih dopolnil in enega zdravila, ki vsebujejo vitamin D₃ in so dostopni v prosti prodaji. Koncentracijo vitamina D₃ sem določala s pomočjo umeritvene krivulje z metodo visokotlačne tekočinske kromatografije (HPLC).

Podatki o posameznih vzorcih so zbrani v tabeli 2.

Tabela 2: Podatki o analiziranih vzorcih

Oznaka vzorca	Vsebnost vitamina D ₃ v eni tableti/kapsuli, zapisana na deklaraciji izdelka	Dodatne sestavine	Oblika	Mesto nakupa	Cena na 1000 I. E.
sp001 = zdravilo	1000 I. E. (25 µg)	manitol, natrijev karboksimesitil škrob, koruzni škrob, mikrokristalna celuloza, smukec, magnezije stearat, brezvodni koloidni silicijev dioksid, natrijev askorbat, vseracemni α-tokoferol, modificirani škrob, saharoza in srednjeveržni trigliceridi	tableta	lekarna	0,36 €
sp002	1000 I. E. (25 µg)	sladilo izomalt, sredstvo proti sprijemanju magnezijeve soli jedilnih maščobnih kislin	tableta	lekarna	0,21 €
sp003	2000 I. E. (50 µg)	stabilizator mikrokristalna celuloza, sredstvo proti sprijemanju dikalcijev fosfat, sredstvo proti sprijemanju magnezijev stearat	tableta	lekarna	0,09 €
sp004	1000 I. E. (25 µg)	repično olje, želatina, sredstvo za ohranjanje vlage, glicerol, barvilo riboflavin	mehka kapsula	trgovina	0,05 €
sp005	2000 I. E. (50 µg)	maščobne kisline srednjeveržnih trigliceridov, želatina, prečiščena voda, glicerol, α-tokoferol, s tokoferoli bogat izvleček	mehka kapsula	splet	0,03 €

3.1.1 Uporabljene kemikalije

Uporabljene kemikalije so skupaj s podatki o čistosti in njihovem proizvajalcu zbrane v tabeli 3.

Tabela 3: Podatki o uporabljenih kemikalijah

Ime kemikalije	Podatki o čistosti in proizvajalcu
cholecalciferol (standard)	≤ 98 % Sigma-Aldrich, Co.
metanol (za standard in vzorce)	98 % Sigma-Aldrich, Co.
metanol (HPLC)	99,9 % J. T. Baker
fosforjeva kislina	HPLC grade
acetonitril (HPLC)	99,9 % LabExpert
metanojska kislina	98–100 % EMSURE

3.1.2 Merilni instrumenti

Instrumenti, ki sem jih uporabila pri merjenju:

- Thermo Accela 1250 HPLC s PDA-detektorjem (Thermo Fischer Scientific),
- avtomatska analizna tehtnica (OHAUS),
- avtomatska pipeta (100–1000 µL),
- elektronska pipeta (Eppendorf).

3.1.3 Laboratorijski inventar

Laboratorijski pripomočki, ki sem jih uporabila pri delu:

- stresalnik Vibromix 10 (OHAUS),
- ultrazvočna kopel (Sonic),
- centrifuga (Hettich),
- injekcijska igla,
- viala HPLC z zamaškom na navoj,
- mikrofilter 13 mm 0,45 µm PP (Advion Interchim),
- čaša (50 mL),
- plastična centrifugirka (»falkonka«),
- konica za pipete (»tips«),

- brizga (BD Discardit II).

3.1.4 Priprava osnovnih raztopin

- **0,1 % fosforjeva kislina v milliQ²**

V reagenčno steklenico sem odpipetirala 2,5 mL fosforjeve kisline (HPLC grade) in z merilnim valjem dodala 2,5 L milliQ.

- **0,1 % metanojska kislina v milliQ**

V reagenčno steklenico sem odpipetirala 2,5 mL metanojske kisline (98–100 % EMSURE) in z merilnim valjem dodala 2,5 L milliQ.

- **Osnovna raztopina standarda vitamina D₃ (holekalciferol) za umeritveno krivuljo**

Zatehtala sem 50 mg holekalciferola (čistost ≤ 98 %) in z elektronsko pipeto dodala približno 50 mL metanola. Nato sem dala raztopino na ultrazvok za približno 5 minut, da se je standard v celoti raztopil. Standard sem pripravila v koncentraciji 1000 mg/L.



Slika 4: Osnovna raztopina standarda vitamina D₃ (holekalciferol)

² MilliQ je dvakrat destilirana voda.

3.1.5 Priprava raztopin izbranih vzorcev

VZORCI sp001, sp002 in sp003 (tablete): V plastično centrifugirko sem zatehtala eno tableto in ji dodala 1,0 mL 0,1 % fosforjeve kisline. Raztopino sem na stresalniku stresala (vorteksirala) 2 minuti. Nato sem dodala 4,0 mL metanola (4 x 1,0 mL) in med vsakim dodatkom metanola vzorec še nekaj sekund vorteksirala, da sem dobila lepo homogeno zmes. Vzorec sem dala v ultrazvočno kopel za 10 minut in ga nato ponovno stresala. Po stresanju sem vzorec centrifugirala 10 minut pri 4 °C in 5000 obratih na minuto. Supernatant sem pred HPLC-analizo filtrirala skozi 0,45 µm PP-filter.

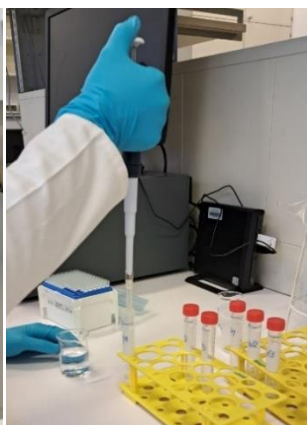
VZORCA sp004 in sp005 (kapsule): Kapsulo sem predrila s pomočjo injekcijske igle. Vsebino sem iztisnila iz kapsule v plastično centrifugirko in zabeležila zatehtano maso tekočine. Nato sem dodala 4,0 mL metanola (4 x 1,0 mL) in med vsakim dodatkom metanola vzorec še za par sekund stresala, da sem dobila lepo homogeno zmes. Vzorec sem postavila v ultrazvočno kopel za 10 minut in ga nato ponovno stresala. Po stresanju sem vzorec centrifugirala 10 minut pri 4 °C in 5000 obratih na minuto. Supernatant sem pred HPLC-analizo filtrirala skozi 0,45 µm PP-filter.



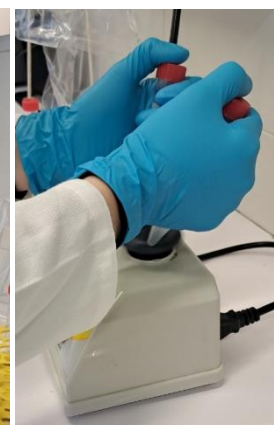
Slika 5: Primer prebadanja kapsule



Slika 6: Primer tehtanja vzorca



Slika 7: Primer dodajanja metanola



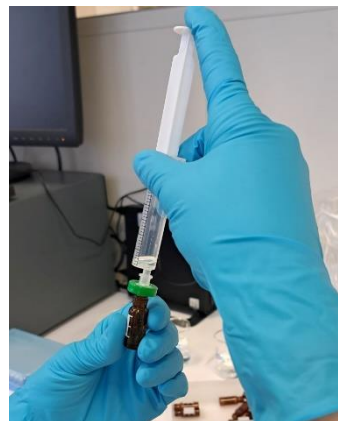
Slika 8: Primer stresanja



Slika 9: Ultrazvočna kopel



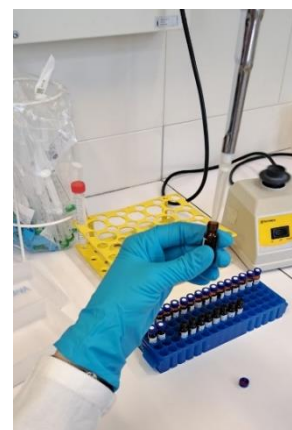
Slika 10: Centrifugiranje



Slika 11: Filtriranje

3.1.6 Priprava raztopin za umeritveno krivuljo

Za umeritveno krivuljo sem pripravila 11 raztopin standarda vitamina D₃ različnih koncentracij, in sicer od 1000 mg/L do 1 mg/L z zaporedno razredčitvijo. Tako sem pripravila 11 kalibracijskih raztopin.



Slika 12: Priprava raztopin za umeritveno krivuljo

3.1.7 Priprava vzorcev za HPLC-analizo

V vialo sem odpipetirala 750 μ L filtriranega supernatanta vzorca. Vsak vzorec sem pripravila v treh paralelkah.

3.1.8 Meritev s HPLC-sistemom

Tabela 4: Kromatografski pogoji za merjenje vitamina D₃

Inštrument	Thermo Accela 1250 HPLC with PDA detector
Kolona	Accucore C18, 4,6 x 100; 2,6 µm
Temperatura kolone	60 °C
Volumen injektiranja	2 µL
Pretok	800 µL/min
Mobilna faza A Mobilna faza B	0,1 % formic acid v MilliQ acetonitrile
Potisna tekočina	acetonitrile
Metoda	gradientna

Kalibracijske raztopine in vzorce sem trikrat pomerila. Dobljeni kromatogrami so bili nato obdelani s programsko opremo, s katero sem dobila površino vrha kot rezultat meritve. Za določitev vitamina v vzorcih sem z njimi primerjala kromatograme standarda. Dobljene meritve sem nato analizirala s pomočjo Excela in iz kalibracijskih raztopin narisala umeritveno krivuljo ter določila linearno območje. Neznano koncentracijo vitamina D₃ sem izračunala s pomočjo enačbe linearne funkcije.

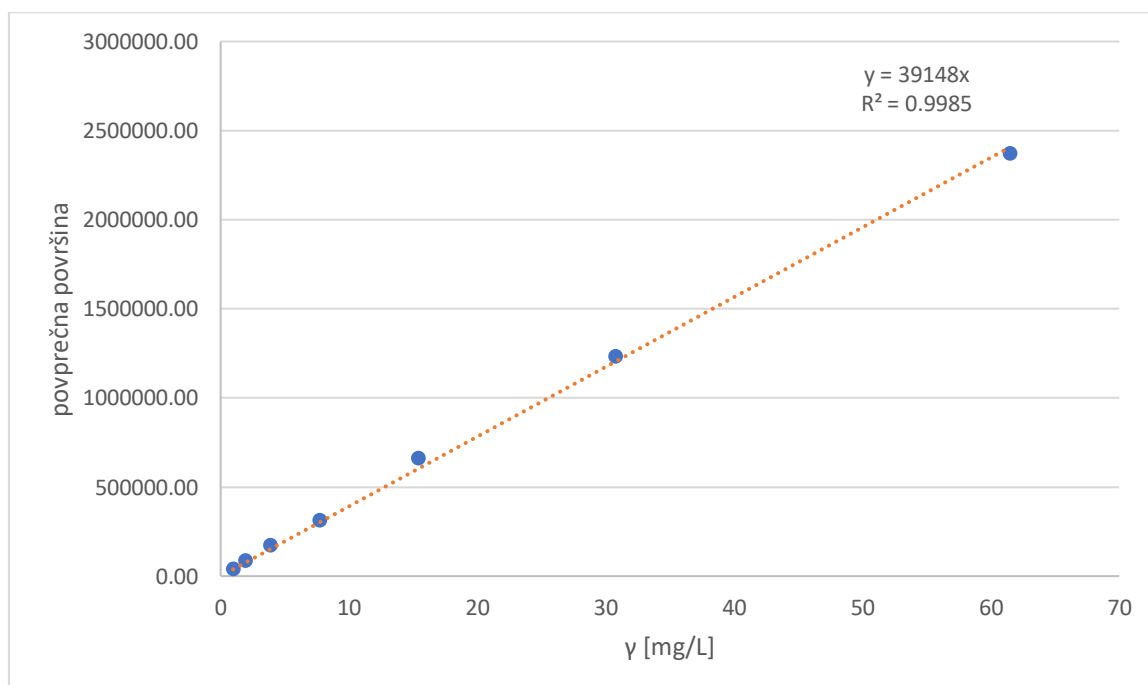
3.2 Meritve in rezultati

3.2.1 Umeritvena krivulja

Tabela 5: Meritve kalibracijskih raztopin

Oznaka	γ [mg/L]	Površina 1	Površina 2	Površina 3	Povprečna površina	RSD
std1	0,960476563	39526	38435	42216	40059,00	5 %
std2	1,920953125	92846	97214	70304	86788,00	17 %
std4	3,84190625	182692	137620	196851	172387,67	18 %
std8	7,6838125	299604	312383	332830	314939,00	5 %
std16	15,367625	603209	600234	779397	660946,67	16 %
std32	30,73525	1135427	1428052	1137398	1233625,67	14 %
std63	61,4705	2244789	2819855	2054076	2372906,67	17 %
std125	122,941	4939338	5949845	5262317	5383833,33	10 %
std250	245,882	8173288	8376916	8210952	8253718,67	1 %
std500	491,764	11660156	13317000	12250970	12409375,33	7 %
std1000	983,528	14091261	16139030	15874553	15368281,33	7 %

Grafikon 1: Povprečna površina vrha z znanimi koncentracijami standarda vitamina D₃ znotraj linearnega območja



S podatki sem določila linearno enačbo umeritvene krivulje $y = 39148x + n$, pri čemer je y povprečna površina vrha, x pa koncentracija. n je pri vitaminih 0. Varianca znaša 0,9992.

3.2.2 Vzorci

Tabela 6: Rezultati izmerjenih površin vrhov vitamina D₃ pri posameznih vzorcih

Oznaka vzorca	V [mL]	Površina 1	Površina 2	Površina 3	Povprečna površina	RSD
sp001-1	5	182882	172902	148561	168115	10,5 %
sp001-2	5	172317	154500	147227	158015	8,2 %
sp001-3	5	173041	151222	144504	156256	9,5 %
sp002-1	5	168168	158760	165250	164059	2,9 %
sp002-2	5	143342	154869	158321	152177	5,2 %
sp002-3	5	160668	156539	166628	161278	3,1 %
sp003-1	5	210751	260324	271120	247398	13,0 %
sp003-2	5	210990	260797	278275	250021	14,0 %
sp003-3	5	279709	259599	278472	272593	4,1 %
sp004-1	5	28380	31256	34354	31330	9,5 %
sp004-2	5	31977	29190	30061	30409	4,7 %
sp004-3	5	30003	27917	27405	28442	4,8 %
sp005-1	5	23366	21923	21041	22110	5,3 %
sp005-2	5	22500	22704	20707	21970	5,0 %
sp005-3	5	23937	22576	20358	22290	8,1 %

V tabeli 6 so zbrane meritve testiranih vzorcev na podlagi posnetih kromatogramov.

Tabela 7: Končni rezultati

Oznaka vzorca	Vsebnost vitamina D ₃ (holekalciferola) v eni tableti ali kapsuli, ki je zapisana na deklaraciji izdelka	Oblika	Mesto nakupa	Preračunane vrednosti I. E.
sp001	1000 I. E. (25 µg)	tableta	lekarna	822
sp002	1000 I. E. (25 µg)	tableta	lekarna	813
sp003	2000 I. E. (50 µg)	tableta	lekarna	1311
sp004	1000 I. E. (25 µg)	mehka kapsula	trgovina	1339
sp005	2000 I. E. (50 µg)	mehka kapsula	splet	445

V tabeli 7 so navedene vrednosti vitamina D₃, ki so zapisane na deklaracijah posameznih izdelkov, in vrednosti vitamina D₃, ki sem jih ugotovila z analizo.

Vzorec sp001 je služil kot kontrola moje napake, saj bi z njim v primeru izrazitih odstopanj ugotovila, da moja metoda analize ni bila primerna, obenem pa lahko primerjam, ali je kvaliteta prehranskih dopolnil primerljiva z zdravilom. Zdravila so namreč pod strožjim inšpekcijskim nadzorom, zato sem predpostavila, da nimajo večjih odstopanj od navedenih vrednosti. Pri analiziranem zdravilu sem izračunala -17,8 % odstopanja. Skleпам, da je do odstopanja prišlo pri pripravi vzorca, saj sem verjetno izbrala drugačno topilo kot podjetje, ki je vzorec testiralo za deklarirano vrednost, prav tako dopuščam možnost napake pri svojem delu.

V skladu s smernicami Evropske komisije je prehranskim dopolnilom dovoljeno odstopanje v območju od -20 % do +50 %, vključno z merilno negotovostjo (12). Na podlagi teh smernic sem ugotavljala, ali so prehranska dopolnila v dopustnem območju odstopanja. Tista, ki so bila, sem nato primerjala še z zdravilom, da bi ugotovila, ali se po kakovosti lahko z njim primerjajo.

Tabela 8: Izračunana odstopanja od deklariranih vrednosti

Oznaka vzorca	Izračunano odstopanje od deklarirane vrednosti
sp002	-18,7 %
sp003	-34,4 %
sp004	+33,9 %
sp005	-77,7 %

Pri vzorcu **sp002** opazimo odstopanje, primerljivo z odstopanjem zdravila. Prav tako je to odstopanje v dopustnem območju glede na smernice Evropske komisije.

Pri vzorcu **sp003** opazimo odstopanje, ki ni v dovoljenem območju glede na smernice Evropske komisije.

Pri vzorcu **sp004** opazimo odstopanje, ki je v dopustnem območju glede na smernice Evropske komisije, ni pa primerljivo z odstopanjem pri zdravilu.

Pri vzorcu **sp005** opazimo izrazito odstopanje, ki za več kot 3-krat presega spodnjo mejo dovoljenega območja glede na smernice Evropske komisije.

3.3 Diskusija

Z raziskovalno nalogo sem želela ugotoviti, ali so podatki o vsebnosti vitamina D₃, ki so zapisani na deklaraciji prehranskih dopolnil, točni. Analizirala sem tablete in kapsule štirih prehranskih dopolnil, dostopnih v prosti prodaji, za kontrolo svoje napake pa sem analizirala še en vzorec zdravila. Na embalaži vseh izdelkov sta navedeni masa vitamina D₃ in enota I. E. v eni tableti oziroma kapsuli, hkrati pa so navedene še pomožne snovi.

1. Prehransko dopolnilo, ki je kupljeno v lekarni, ima na deklaraciji točno zapisano koncentracijo holekalciferola.

To hipotezo lahko le delno potrdim.

V lekarni sta bila kupljena vzorca sp002 in sp003, oba v obliki tablet. Vrednost vzorca sp002 (813 I. E.) je bila primerljiva z deklarirano (1000 I. E.), njeno odstopanje pa je bilo prav tako primerljivo z zdravilom. Za vzorec sp003 pa je že sama preračunana vrednost (1311 I. E.) precej nižja od deklarirane (2000 I. E.). Do določenega odstopanja je lahko prišlo tudi, ker vzorec sp003 vsebuje več dodatnih sestavin kot vzorec sp002, kar se vidi tudi na kromatogramu pri 1,5 minute.

2. Prehransko dopolnilo, ki je kupljeno preko spleta ali v trgovini, na deklaraciji nima točno zapisane koncentracije holekalciferola.

To hipotezo lahko le delno potrdim.

Preko spleta in v trgovini sta bila kupljena vzorca sp004 in sp005. Pri vzorcu sp004 je ugotovljena vrednost (1339 I. E.) višja od navedene (1000 I. E.), a je še vseeno v dovoljenem območju odstopanja, zato hipoteze, da vrednost holekalciferola na njegovi deklaraciji ni točna, ne morem potrditi. Pri vzorcu sp005 pa je bila ugotovljena vrednost holekalciferola (445 I. E.) izrazito prenizka glede na deklarirano vrednost (2000 I. E.), zato lahko potrdim, da na deklaraciji nima točno zapisane koncentracije holekalciferola.

Vzorca sp002 in sp003 sta bila tako kot zdravilo v obliki tablete, zato predvidevam, da jima je bila analitska metoda bolj naklonjena kot vzorcema sp004 in sp005, ki sta bila v obliki kapsul. Vzorca kapsul prav tako nisem mogla primerjati z zdravilom, saj

v Sloveniji zdravila z vitaminom D₃ v obliki kapsul ni. Vseeno menim, da kapsulam manj naklonjena metoda ne bi mogla povzročiti tolikšnih odstopanj pri pravilno deklariranih prehranskih dopolnilih, saj se tudi njuni napaki ne moreta primerjati. Vprašanje o ustreznosti deklaracije vzorca sp004 zato puščam odprto, za vzorec sp005 pa kljub temu menim, da je zaradi tako izrazitega odstopanja neustrezen.

3. Nižja, kot je cena prehranskega dopolnila, večja so odstopanja dejanske koncentracije vitamina D₃ od zapisane vrednosti na deklaraciji.

To hipotezo lahko potrdim.

Tabela 9: Primerjava odstopanj vrednosti holekalciferola in cen

Oznaka vzorca	Cena na 1000 I. E.	Izračunano odstopanje od deklarirane vrednosti
sp001 (zdravilo)	0,36 €	-17,8 %
sp002	0,21 €	-18,7 %
sp003	0,09 €	-34,4 %
sp004	0,05 €	+33,9 %
sp005	0,03 €	-77,7 %

Iz tabele je razvidno, da s padajočo ceno vzorca odstopanje dejanske vrednosti holekalciferola od navedene narašča. Drugače velja le za vzorca sp003 in sp004, razliko pripisujem mestu nakupa. Dražji vzorec sp003 je bil namreč kupljen v lekarni, cenejši sp004 pa v trgovini.

4 Zaključek

Za raziskovalno nalogo o vitaminu D sem se odločila, ker ima ta vitamin pomembno vlogo v našem telesu, hkrati pa ga večjemu deležu Slovenk in Slovencev pozimi primanjkuje, nekaterim kljub uživanju prehranskih dopolnil. Zato sem želela ugotoviti, ali prehranska dopolnila z vitaminom D₃ res vsebujejo toliko aktivne učinkovine, kot je navedeno na njihovih deklaracijah.

Ugotovila sem, da je imela kar polovica testiranih vzorcev na deklaraciji zapisano neustrezno vsebnost vitamina D₃, med drugim tudi prehransko dopolnilo iz lekarne, ki me je s svojim odstopanjem najbolj presenetilo.

Predvidevam, da postopek priprave vzorcev za obe izmed oblik (tablete in kapsule) ni bil optimalen, saj v članku, katerega metodo sem uporabila, ni bilo opisanega postopka za mehke kapsule. Prav tako na slovenskem trgu ni zdravila v tej obliki, zato je možno, da primerjava zdravila v obliki tablete in prehranskega dopolnila v obliki kapsule ni bila idealna. Za ta del raziskave bi bila zato v prihodnosti smiselna optimizacija metode, predvsem za ekstrakcijo vzorca v obliki kapsule. Poleg tega bi želela testirati še več prehranskih dopolnil, raziskavo pa bi razširila tudi na druge oblike, kot so razpršila in kapljice, za katera bi bila tako kot pri mehkih kapsulah potrebna optimizacija metode. Tako bi me v prihodnosti zanimala tudi primerjava posameznih oblik prehranskih dopolnil.

Ob množični ponudbi prehranskih dopolnil na trgu se zavedam, da vseh dopolnil, zlasti tistih na spletu, ne moremo povsem nadzirati, zato bi bilo poleg strožjih regulacijskih ukrepov nujno tudi večje ozaveščanje potrošnikov o ustreznem nakupu in uporabi prehranskih dopolnil.

5 Viri in literatura

1. **Hribar, Maša, in drugi.** Nutrients. *Nutrihealth Study: Seasonal Variation in Vitamin D Status Among the Slovenian Adult and Elderly Population*. 19. junij 2020.
2. **Peterlin Mašič, Lucija, Obreza, Aleš in Vovk, Tomaž.** *Minerali, vitamini in druge izbrane snovi*. Ljubljana : Slovensko farmacevtsko društvo, 2020.
3. **National Institutes of Health.** Vitamin D. *National Institutes of Health*. [Elektronski] 26. julij 2024. [Navedeno: 6. marec 2025.] <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminD-HealthProfessional/>.
4. *Stability-Indicating HPLC-UV Method for Vitamin D3 Determination in Solutions, Nutritional Supplements and Pharmaceuticals.* **Temova, Žane in Roškat, Robert.** 2016, Journal of Chromatographic Science.
5. **Thermo Fisher Scientific.** HPLC Basics. *Thermo Fisher Scientific*. [Elektronski] [Navedeno: 7. april 2025.] https://www.thermofisher.com/si/en/home/industrial/chromatography/chromatography-learning-center/liquid-chromatography-information/hplc-basics.html?erpType=Global_E1#menu1.
6. **Javna agencija RS za zdravila in medicinske pripomočke.** Opredelitev (razvrščanje) izdelkov. *jazmp.si*. [Elektronski] julij 2022. [Navedeno: 11. marec 2025.] <https://www.jazmp.si/fileadmin/datoteke/dokumenti/SRZHPD/Smernice%20za%20opredelitev%20izdelkov.pdf>.
7. **Campbell, Neil A. in Reece, Jane B.** *Biologija 2 : zgradba in delovanje organizmov : učbenik za gimnazije in srednje strokovne šole*. Celovec : Mohorjeva založba, 2015.
8. **Inštitut za nutricionistiko.** Vitamin D. *Prehrana.si*. [Elektronski] [Navedeno: 3. marec 2025.] <https://www.prehrana.si/sestavine-zivil/vitamini/vitamin-d>.
9. **Nacionalni inštitut za javno zdravje RS.** Pomen vitamina D. *nijz.si*. [Elektronski] 28. november 2022. [Navedeno: 3. marec 2025.] <https://nijz.si/obmocna-enota-novo-mesto/pomen-vitamina-d/>.
10. **Karara Geršak, Ema Luna.** Učinki vitamina D na zdravje ljudi. Ljubljana : s.n., 2021.
11. *Test prehranskih dopolnil z vitaminom D.* **Kremič, Nika.** Ljubljana : s.n., 2019, Revija zveze potrošnikov Slovenije.
12. **Generalni direktorat za zdravje in potrošnike.** gov.si. [Elektronski] december 2012. <https://www.gov.si/assets/organi-v-sestavi/UVHVVR/Varna-hrana/Oznacevanje-zivil/Smernice-za-izracun-hranilnih-vrednosti.pdf>.
13. **Thomas, Liji.** Vitamin D Biochemistry. *News-Medical.Net*. [Elektronski] AZoNetwork, 17. januar 2023. [Navedeno: 19. februar 2025.] <https://www.news-medical.net/health/Vitamin-D-Biochemistry.aspx>.



14. **Shimadzu Corporation.** What is HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ? .
Shimadzu. [Elektronski] [Navedeno: 7. april 2025.] https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html.

6 Priloge

6.1 Primer izračuna koncentracije vitamina D₃ na osnovi umeritvene krivulje (vzorec sp001-1, povprečna meritev)

1) Rezultati izmerjenih površin vrhov:

Oznaka vzorca	V [mL]	Povprečna površina
sp001-1	5	168115

2) Vstavimo površino vrhov v linearno enačbo umeritvene krivulje:

povprečna površina vrhov: $y = 168115$

linearna enačba: $y = 39148 x$

$$x = \frac{y}{39148} = \frac{168115}{39148} = 4,29 \text{ mg/L} = \gamma (\text{vitD}_3) \text{ avg}$$

Oznaka vzorca	V [mL]	γ (vitD ₃) avg [mg/L]
sp001-1	5	4,29

3) Izračunamo maso vitamina D₃:

$$m (\text{vitD}_3) = \gamma \text{ avg} \cdot V = 4,29 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \cdot \frac{5}{1000} \text{ L} = 0,0215 \text{ mg}$$

Oznaka vzorca	m (vitD ₃) avg [mg]
sp001-1	0,0215

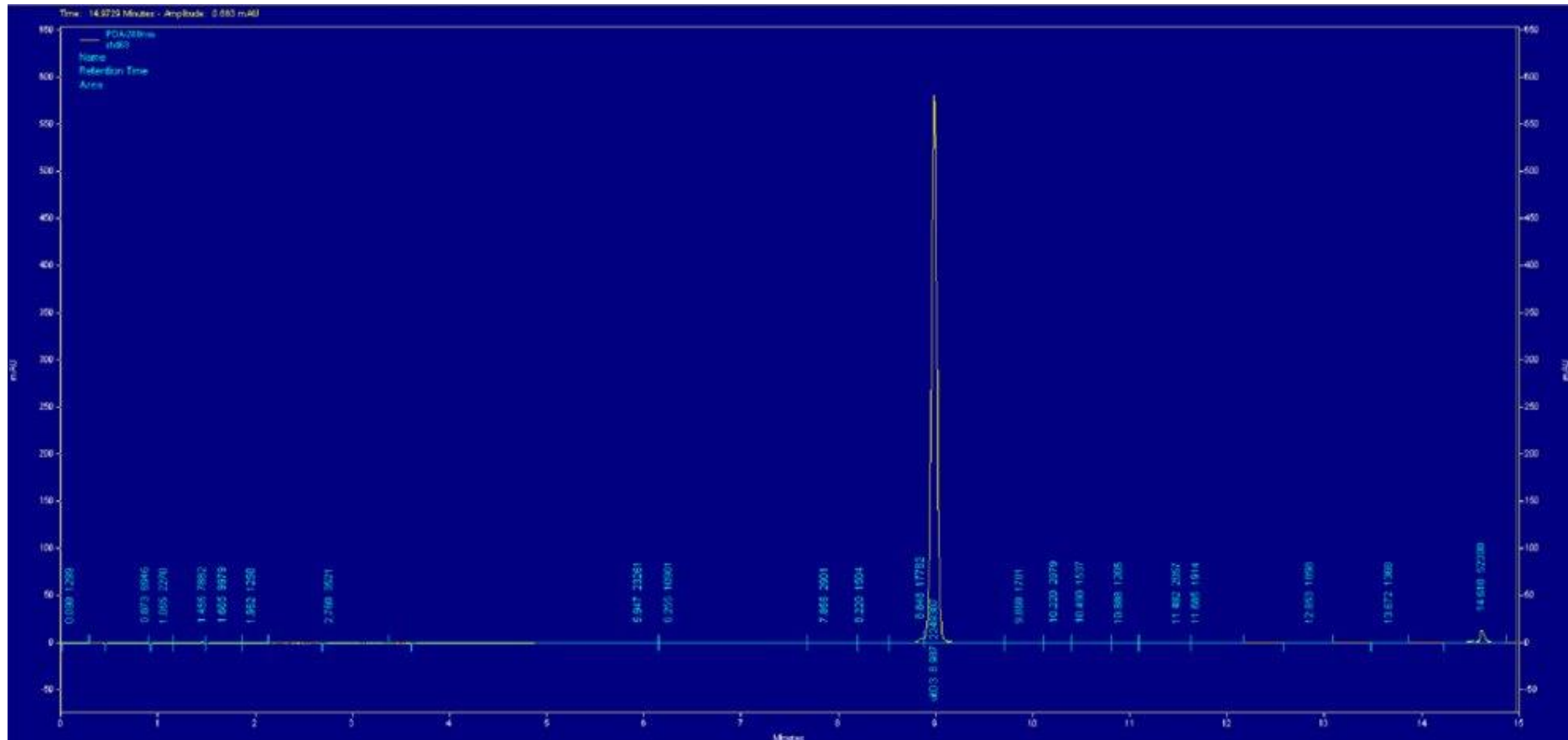
4) Preračunamo vrednost mase v I. E.:

$$0,0215 \text{ mg} \dots x$$

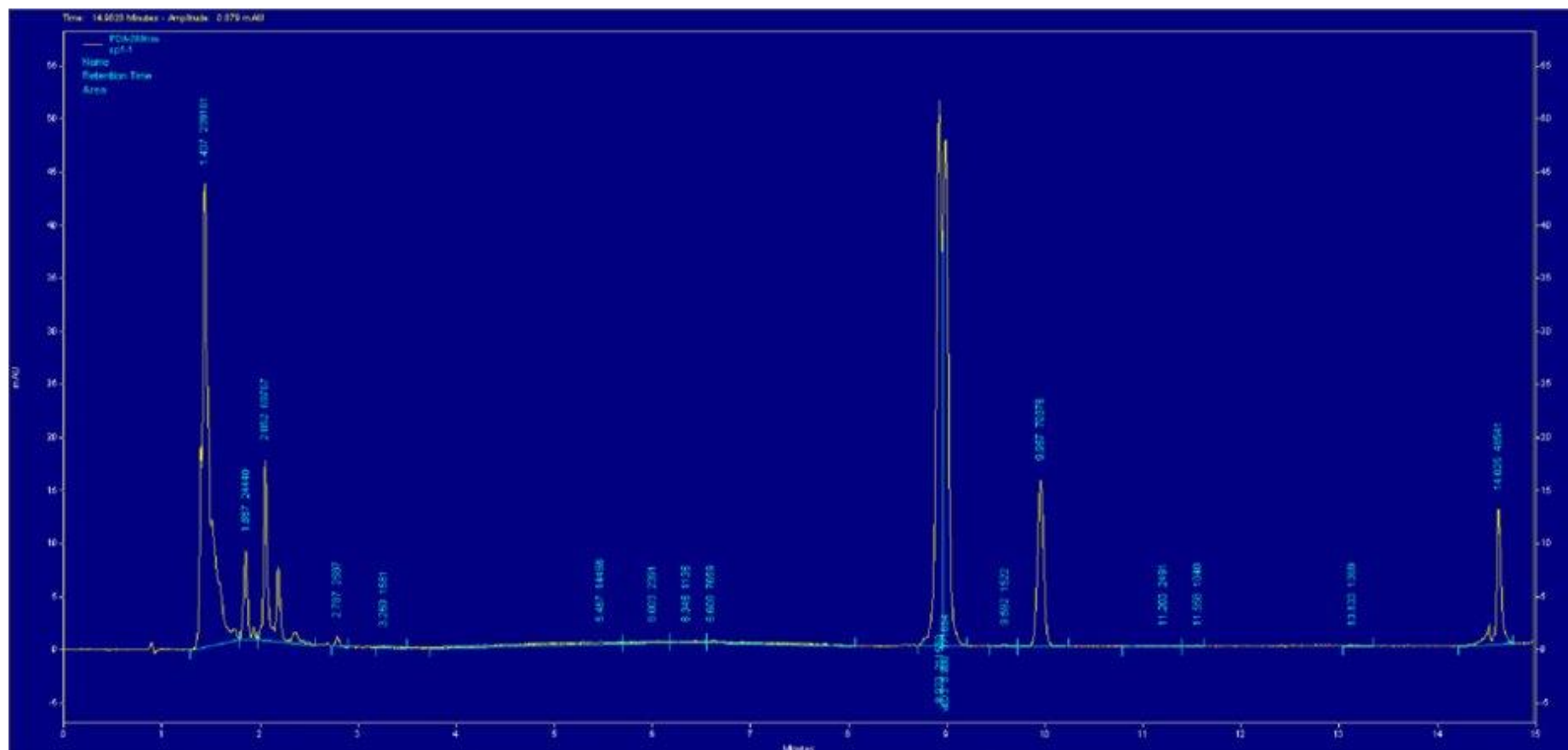
$$0,0250 \text{ mg} \dots 1000 \text{ I.E.}$$

$$x = \mathbf{860 \text{ I.E.}}$$

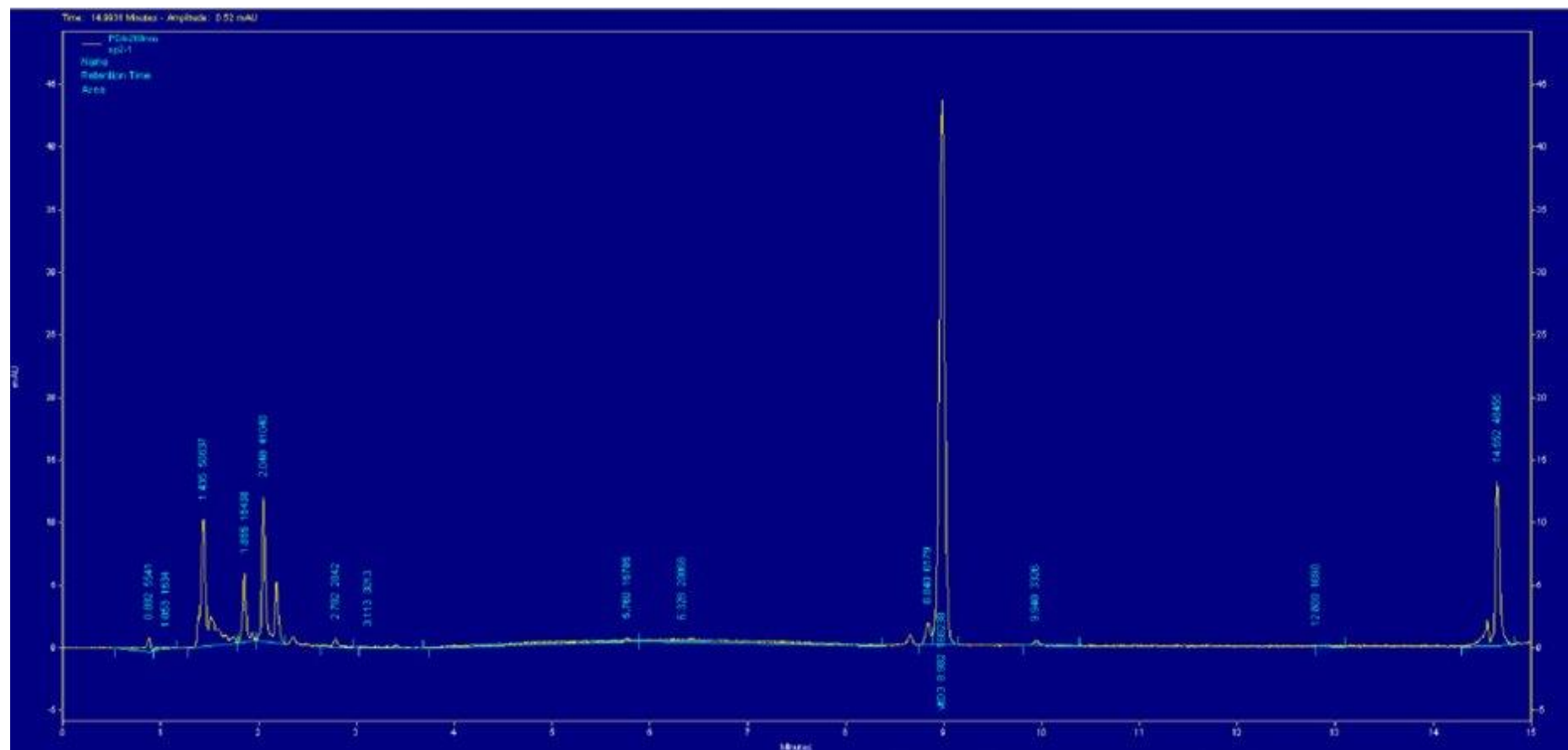
6.2 Kromatogram standarda vitamina D₃ pri koncentraciji pribl. 63 mg/L pri izbranih kromatografskih pogojih



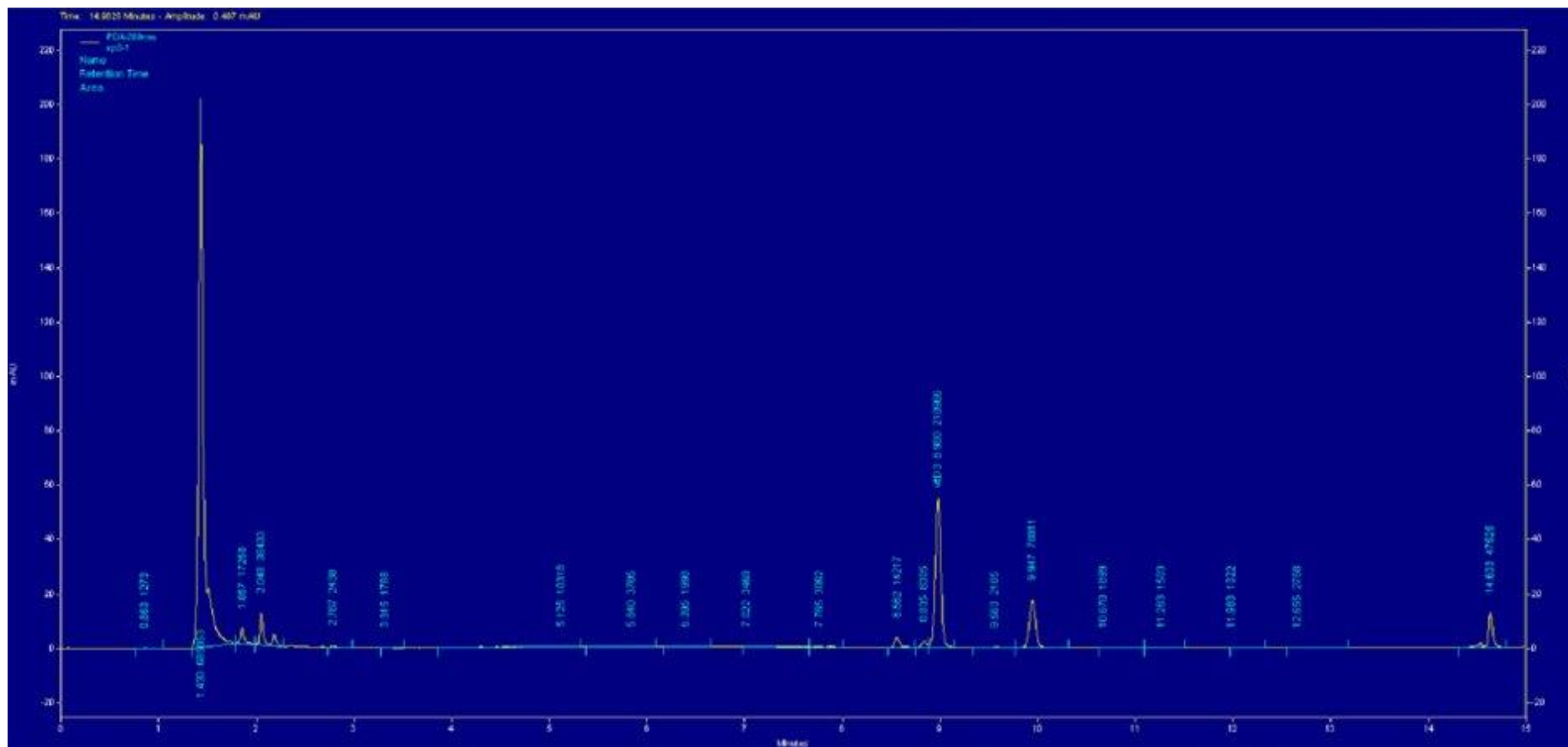
6.3 Kromatogram vzorca sp001



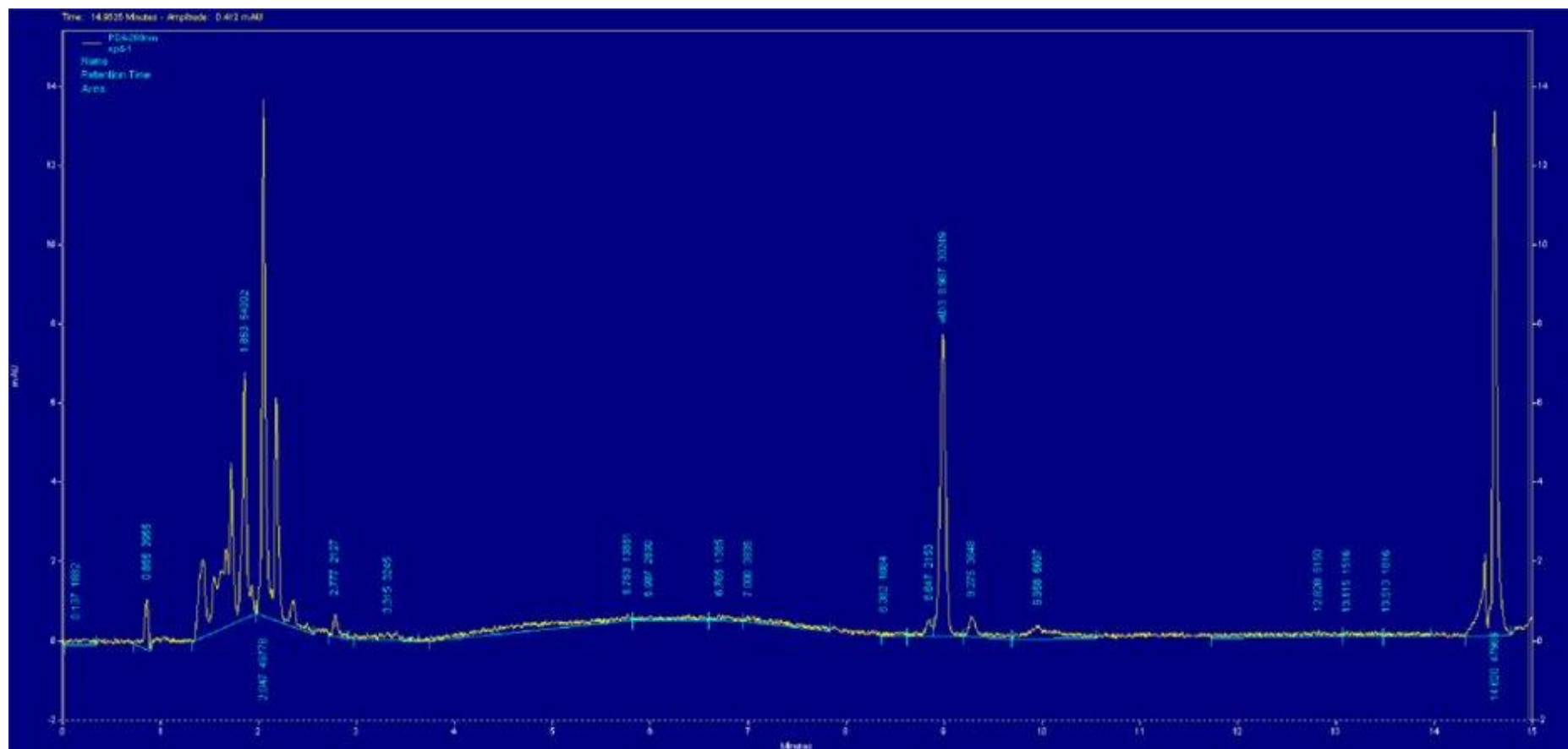
6.4 Kromatogram vzorca sp002



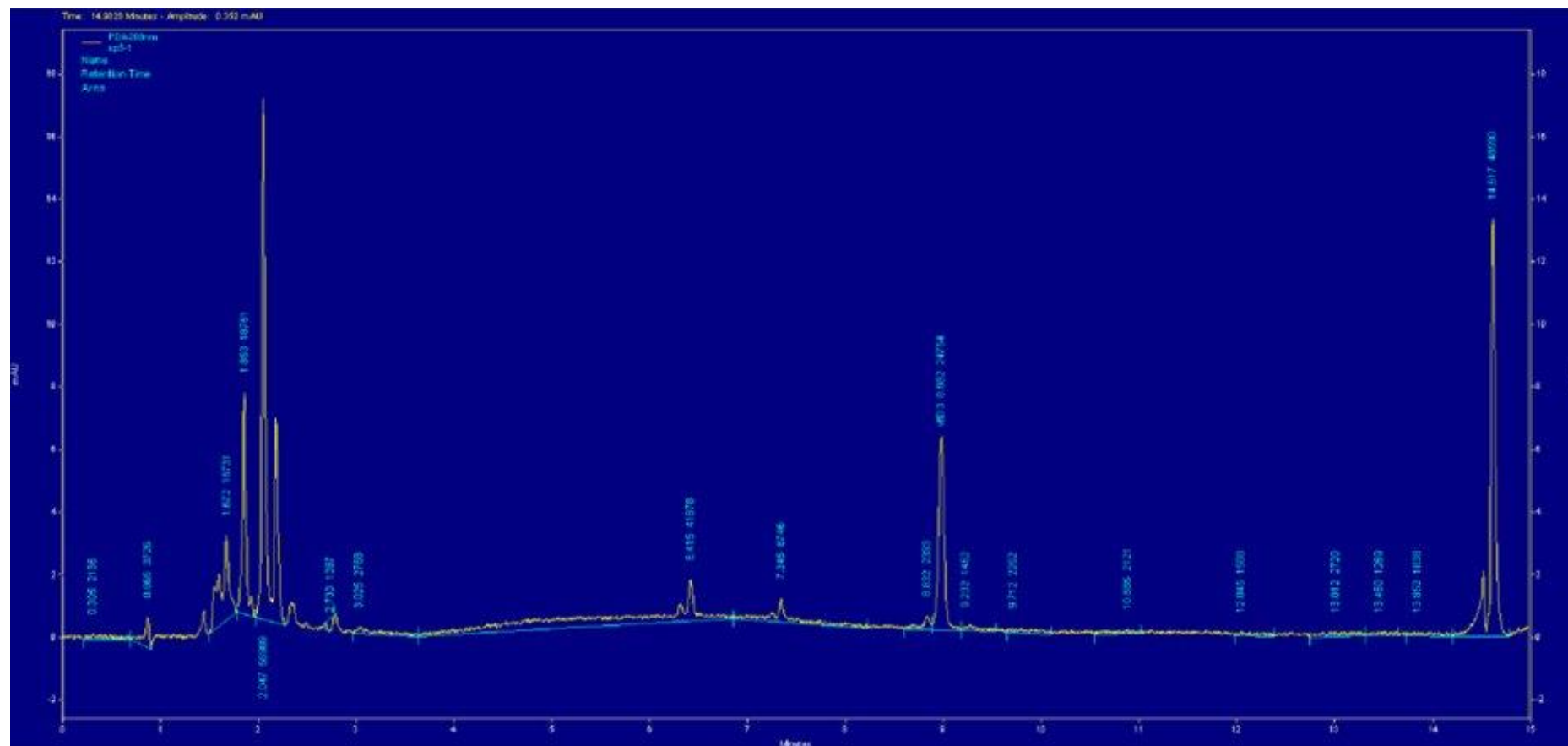
6.5 Kromatogram vzorca sp003



6.6 Kromatogram vzorca sp004



6.7 Kromatogram vzorca sp005



6.8 Sekvenca

Sequence: vitD3-20241111-UV-ex003-sp1-5.seq					
Run #	Vial	Volume (µL)	Sample ID	Method	Filename
1	A.1	2	std1	vitD3.met	24-11-11-std1.dal
2	A.2	2	std2	vitD3.met	24-11-11-std2.dal
3	A.3	2	std4	vitD3.met	24-11-11-std4.dal
4	A.4	2	std8	vitD3.met	24-11-11-std8.dal
5	A.5	2	std16	vitD3.met	24-11-11-std16.dal
6	A.6	2	std32	vitD3.met	24-11-11-std32.dal
7	A.7	2	std63	vitD3.met	24-11-11-std63.dal
8	A.8	2	std125	vitD3.met	24-11-11-std125.dal
9	A.9	2	std250	vitD3.met	24-11-11-std250.dal
10	A.10	2	std500	vitD3.met	24-11-11-std500.dal
11	A.11	2	std1000	vitD3.met	24-11-11-std1000.dal
12	A.12	2	sp1-1	vitD3.met	24-11-11-sp1-1.dal
13	A.13	2	sp1-2	vitD3.met	24-11-11-sp1-2.dal
14	A.14	2	sp1-3	vitD3.met	24-11-11-sp1-3.dal
15	A.15	2	sp2-1	vitD3.met	24-11-11-sp2-1.dal
16	A.16	2	sp2-2	vitD3.met	24-11-11-sp2-2.dal
17	A.17	2	sp2-3	vitD3.met	24-11-11-sp2-3.dal
18	A.18	2	sp3-1	vitD3.met	24-11-11-sp3-1.dal
19	A.19	2	sp3-2	vitD3.met	24-11-11-sp3-2.dal
20	A.20	2	sp3-3	vitD3.met	24-11-11-sp3-3.dal
21	A.21	2	sp4-1	vitD3.met	24-11-11-sp4-1.dal
22	A.22	2	sp4-2	vitD3.met	24-11-11-sp4-2.dal
23	A.23	2	sp4-3	vitD3.met	24-11-11-sp4-3.dal
24	A.24	2	sp5-1	vitD3.met	24-11-11-sp5-1.dal
25	A.25	2	sp5-2	vitD3.met	24-11-11-sp5-2.dal
26	A.26	2	sp5-3	vitD3.met	24-11-11-sp5-3.dal
27	A.1	2	std1r	vitD3.met	24-11-11-std1r.dal
28	A.2	2	std2r	vitD3.met	24-11-11-std2r.dal
29	A.3	2	std4r	vitD3.met	24-11-11-std4r.dal
30	A.4	2	std8r	vitD3.met	24-11-11-std8r.dal
31	A.5	2	std16r	vitD3.met	24-11-11-std16r.dal
32	A.6	2	std32r	vitD3.met	24-11-11-std32r.dal
33	A.7	2	std63r	vitD3.met	24-11-11-std63r.dal
34	A.8	2	std125r	vitD3.met	24-11-11-std125r.dal
35	A.9	2	std250r	vitD3.met	24-11-11-std250r.dal
36	A.10	2	std500r	vitD3.met	24-11-11-std500r.dal
37	A.11	2	std1000r	vitD3.met	24-11-11-std1000r.dal
38	A.12	2	sp1-1r	vitD3.met	24-11-11-sp1-1r.dal
39	A.13	2	sp1-2r	vitD3.met	24-11-11-sp1-2r.dal
40	A.14	2	sp1-3r	vitD3.met	24-11-11-sp1-3r.dal
41	A.15	2	sp2-1r	vitD3.met	24-11-11-sp2-1r.dal
42	A.16	2	sp2-2r	vitD3.met	24-11-11-sp2-2r.dal
43	A.17	2	sp2-3r	vitD3.met	24-11-11-sp2-3r.dal
44	A.18	2	sp3-1r	vitD3.met	24-11-11-sp3-1r.dal
45	A.19	2	sp3-2r	vitD3.met	24-11-11-sp3-2r.dal
46	A.20	2	sp3-3r	vitD3.met	24-11-11-sp3-3r.dal
47	A.21	2	sp4-1r	vitD3.met	24-11-11-sp4-1r.dal
48	A.22	2	sp4-2r	vitD3.met	24-11-11-sp4-2r.dal
49	A.23	2	sp4-3r	vitD3.met	24-11-11-sp4-3r.dal
50	A.24	2	sp5-1r	vitD3.met	24-11-11-sp5-1r.dal
51	A.25	2	sp5-2r	vitD3.met	24-11-11-sp5-2r.dal
52	A.26	2	sp5-3r	vitD3.met	24-11-11-sp5-3r.dal
53	A.1	2	std1nr	vitD3.met	24-11-11-std1nr.dal
54	A.2	2	std2nr	vitD3.met	24-11-11-std2nr.dal
55	A.3	2	std4nr	vitD3.met	24-11-11-std4nr.dal
56	A.4	2	std8nr	vitD3.met	24-11-11-std8nr.dal
57	A.5	2	std16nr	vitD3.met	24-11-11-std16nr.dal
58	A.6	2	std32nr	vitD3.met	24-11-11-std32nr.dal
59	A.7	2	std63nr	vitD3.met	24-11-11-std63nr.dal
60	A.8	2	std125nr	vitD3.met	24-11-11-std125nr.dal
61	A.9	2	std250nr	vitD3.met	24-11-11-std250nr.dal
62	A.10	2	std500nr	vitD3.met	24-11-11-std500nr.dal
63	A.11	2	std1000nr	vitD3.met	24-11-11-std1000nr.dal
64	A.12	2	sp1-1nr	vitD3.met	24-11-11-sp1-1nr.dal
65	A.13	2	sp1-2nr	vitD3.met	24-11-11-sp1-2nr.dal
66	A.14	2	sp1-3nr	vitD3.met	24-11-11-sp1-3nr.dal
67	A.15	2	sp2-1nr	vitD3.met	24-11-11-sp2-1nr.dal
68	A.16	2	sp2-2nr	vitD3.met	24-11-11-sp2-2nr.dal
69	A.17	2	sp2-3nr	vitD3.met	24-11-11-sp2-3nr.dal
70	A.18	2	sp3-1nr	vitD3.met	24-11-11-sp3-1nr.dal
71	A.19	2	sp3-2nr	vitD3.met	24-11-11-sp3-2nr.dal
72	A.20	2	sp3-3nr	vitD3.met	24-11-11-sp3-3nr.dal
73	A.21	2	sp4-1nr	vitD3.met	24-11-11-sp4-1nr.dal
74	A.22	2	sp4-2nr	vitD3.met	24-11-11-sp4-2nr.dal
75	A.23	2	sp4-3nr	vitD3.met	24-11-11-sp4-3nr.dal
76	A.24	2	sp5-1nr	vitD3.met	24-11-11-sp5-1nr.dal
77	A.25	2	sp5-2nr	vitD3.met	24-11-11-sp5-2nr.dal
78	A.26	2	sp5-3nr	vitD3.met	24-11-11-sp5-3nr.dal

Sequence: vtd3-20241111-UV-ex003-sp1-5.seq					
Run #	Vial	Volume (µL)	Sample ID	Method	Filename
50	A.24	2	sp5-1n	vtd3.met	24-11-11-sp5-1n.dat
51	A.25	2	sp5-2n	vtd3.met	24-11-11-sp5-2n.dat
52	A.26	2	sp5-3n	vtd3.met	24-11-11-sp5-3n.dat
53	A.1	2	std1n	vtd3.met	24-11-11-std1n.dat
54	A.2	2	std2n	vtd3.met	24-11-11-std2n.dat
55	A.3	2	std4n	vtd3.met	24-11-11-std4n.dat
56	A.4	2	std6n	vtd3.met	24-11-11-std6n.dat
57	A.5	2	std16n	vtd3.met	24-11-11-std16n.dat
58	A.6	2	std32n	vtd3.met	24-11-11-std32n.dat
59	A.7	2	std63n	vtd3.met	24-11-11-std63n.dat
60	A.8	2	std125n	vtd3.met	24-11-11-std125n.dat
61	A.9	2	std250n	vtd3.met	24-11-11-std250n.dat
62	A.10	2	std500n	vtd3.met	24-11-11-std500n.dat
63	A.11	2	std1000n	vtd3.met	24-11-11-std1000n.dat
64	A.12	2	sp1-1n	vtd3.met	24-11-11-sp1-1n.dat
65	A.13	2	sp1-2n	vtd3.met	24-11-11-sp1-2n.dat
66	A.14	2	sp1-3n	vtd3.met	24-11-11-sp1-3n.dat
67	A.15	2	sp2-1n	vtd3.met	24-11-11-sp2-1n.dat
68	A.16	2	sp2-2n	vtd3.met	24-11-11-sp2-2n.dat
69	A.17	2	sp2-3n	vtd3.met	24-11-11-sp2-3n.dat
70	A.18	2	sp3-1n	vtd3.met	24-11-11-sp3-1n.dat
71	A.19	2	sp3-2n	vtd3.met	24-11-11-sp3-2n.dat
72	A.20	2	sp3-3n	vtd3.met	24-11-11-sp3-3n.dat
73	A.21	2	sp4-1n	vtd3.met	24-11-11-sp4-1n.dat
74	A.22	2	sp4-2n	vtd3.met	24-11-11-sp4-2n.dat
75	A.23	2	sp4-3n	vtd3.met	24-11-11-sp4-3n.dat
76	A.24	2	sp5-1n	vtd3.met	24-11-11-sp5-1n.dat
77	A.25	2	sp5-2n	vtd3.met	24-11-11-sp5-2n.dat
78	A.26	2	sp5-3n	vtd3.met	24-11-11-sp5-3n.dat
79	A.1	2	std1n	vtd3.met	24-11-11-std1n.dat
80	A.2	2	std2n	vtd3.met	24-11-11-std2n.dat
81	A.3	2	std4n	vtd3.met	24-11-11-std4n.dat
82	A.4	2	std6n	vtd3.met	24-11-11-std6n.dat
83	A.5	2	std16n	vtd3.met	24-11-11-std16n.dat
84	A.6	2	std32n	vtd3.met	24-11-11-std32n.dat
85	A.7	2	std63n	vtd3.met	24-11-11-std63n.dat
86	A.8	2	std125n	vtd3.met	24-11-11-std125n.dat
87	A.9	2	std250n	vtd3.met	24-11-11-std250n.dat
88	A.10	2	std500n	vtd3.met	24-11-11-std500n.dat
89	A.11	2	std1000n	vtd3.met	24-11-11-std1000n.dat
90		0		vtd3-stdty.met	
91					