



Gimnazija Novo mesto

## **VEGANSTVO IN VITAMIN B12**

(raziskovalna naloga s področja farmacije in nutricionistke)

Avtorici:

Rea Doria Bergant

Tea Vovko

Mentorica:

Janja Pust

Somentorica:

Katarina Sluga Zupančič

Novo mesto, junij 2022

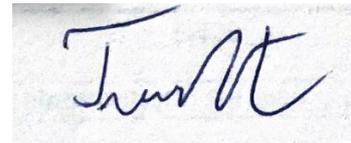
Rea Doria Bergant, Tea Vovko. Veganstvo in vitamin B12

## **IZJAVA**

Podpisani Rea Doria Bergant in Tea Vovko, dijakinji Gimnazije Novo mesto, potrjujeva, da je raziskovalna naloga z naslovom

## **VEGANSTVO IN VITAMIN B12**

nastala kot rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in pri pisanju niso bile kršene avtorske pravice in intelektualne lastnine drugih.

A rectangular image showing a handwritten signature in black ink on a light-colored background. The signature is cursive and appears to read 'Tea Vovko'.A handwritten signature in black ink, reading 'Bergant' in a cursive style.

## **KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

ŠD	Gimnazija Novo mesto, šolsko leto 2021/22
KG	veganstvo / prehrana / vitamin B12 / prehranska dopolnila / HPLC analiza
AV	BERGANT, Rea Doria / VOVKO, Tea
SA	PUST, Janja / SLUGA ZUPANČIČ, Katarina
KZ	Seidlova 9, 8000 Novo mesto
ZA	Gimnazija Novo mesto
LI	2022
IN	VEGANSTVO IN VITAMIN B12
TD	Raziskovalna naloga
OP	88 str., 19 pregl., 9 graf., 35 sl., 3 pril., 61 vir.
IJ	SL
JI	sl / en

AI Vitamin B12 je najbolj kompleksen, v vodi topen vitamin. Sestavlja ga molekula kobalamina, ki jo lahko najdemo v različnih oblikah, te so metilkobalamin in adenzilkobalamin (naravni obliki) ter hidroskobalamin in cianokobalamin (večinoma sintetični obliki). Vitamin B12 pogosto asociiramo z vegani, katerih število v populaciji narašča, iz tega pa je očitno, da veganstvo v današnji družbi postaja vse bolj popularno. Ker je sodobna prehranska tendenca v ospredje zopet postavila uravnotežene obroke, sva se odločili, da s to raziskovalno nalogo v ospredje postaviva vprašanje dejanske uravnoteženosti veganske prehrane, v kateri se ali pa se ne uporabljajo prehranska dopolnila.

Ugotovili sva, da se vitamin B12, ki je za pravilno delovanje človeškega telesa esencialen, nahaja le v prehrani živalskega izvora, kar naju je pripeljalo do zaključka, da vegani brez primernih prehranskih dopolnil ne morejo živeti popolnoma zdravo. Poleg analize nekaterih prehranskih dopolnil sva raziskali tudi slovenski trg in ugotovili, da so vrednosti na nekaterih embalažah lahko varljive oz. nenatančne, da navedeni dnevni odmerki (PDV) ne sledijo uradnim priporočilom in da kupec, ki ob nakupu zahteva certifikat o kakovosti izdelka, tega večinoma ne more dobiti niti na vpogled.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Gimnazija Novo mesto, šolsko leto 2021/22

CX vegans / diet / vitamin B12 / food supplements / HPLC determination

AU BERGANT, Rea Doria / VOVKO, Tea

AA PUST, Janja / SLUGA ZUPANČIČ, Katarina

PP Seidlova 9, 8000 Novo mesto

PB Gimnazija Novo mesto

PY 2022

TI VEGANS DIET AND VITAMIN B12

DT Research work

NO 88 p., 19 pregl., 9 graf., 35 sl., 3 pril., 61 vir.

LA SL

AL sl / en

AB Vitamin B12 is a complex vitamin soluble in water. It consists of cobalamine, a molecule found in different shapes. These shapes are methylcobalamine, adenosylcobalamine (natural shapes), hydroxycobalamine and cyanocobalamine (synthetical shapes). Vitamin B12 is commonly associated with vegans, the number of which is gradually increasing among population, showing that veganism today is becoming more and more popular. Since the appearance of modern food tendencies, leaning more towards a balanced meal than a specific diet, we have decided upon shining a light onto the question of the actual balance of the vegan diet in which there are or are not used specific food supplements.

We found out that vitamin B12, which is essential for the correct function of the human body, can only be extracted from the animal-based foods, which led us to the conclusion, that vegans, without the usage of proper food supplements, are deprived of it. Besides the analysis of some food supplements, we also researched the Slovenian market and discovered how values on certain packaging could be misleading or sloppily measured, moreover, the advised daily intake doesn't follow the official recommendations and the lease of the certificate, demanded by the buyer, isn't even an option.

## **ZAHVALA**

Pri ustvarjanju in oblikovanju naloge sva se obrnili na lektorico, ki je slovnično uredila najino pisanje. Iskreno se ji zahvaljujema.

Zahvaljujema se tudi vsem posameznikom, ki so kakorkoli pripomogli k nastajanju te naloge.

Da je najina naloga v tej obliki sedaj pred vami pa veliko zahvalo dolgujema tudi mentorici in somentorici, ki sta naju peljali skozi proces ustvarjanja te naloge, naju usmerjali in nama omogočili, da sva ustvarili nalogo na katero sva lahko ponosni.

## KAZALO VSEBINE

IZJAVA.....	2
ZAHVALA.....	5
KAZALO SLIK.....	10
KAZALO TABEL.....	11
KAZALO GRAFIKONOV.....	11
1 UVOD.....	12
2 TEORETIČNI DEL.....	13
2.1 VEGANSTVO.....	13
2.1.1 RAZLOGI ZA VEGANSTVO.....	13
2.1.1.1 PORAST VEGETARIJANSTVA.....	13
2.1.1.2 PORAST VEGANSTVA.....	13
2.1.2 PREHRANA VEGANOV.....	14
2.1.2.1 Uravnotežena prehrana vsejedca.....	14
2.1.2.2 Prehrana veganov.....	15
2.2 HRANILA.....	16
2.2.1 GLAVNA HRANILA.....	16
2.2.1.1 VLAKNINE.....	16
2.2.1.2 MAŠČOBE.....	16
2.2.1.3 VITAMINI IN MINERALI.....	17
2.2.1.4 BELJAKOVINE.....	17
2.2.1.5 OGLJIKOVI HIDRATI.....	17
2.2.2 POMANJKANJE HRANIL PRI VEGANIH.....	18
2.3 VITAMIN B12.....	18
2.3.1 MOLEKULA VITAMINA B12.....	18
2.3.1 Oblike vitamina B12 in biorazpoložljivost.....	21
2.3.2 REFERENČNE VREDNOSTI B12 IN DNEVNI VNOS.....	24
2.3.3 POMANJKANJE VITAMINA B12.....	27
2.3.3.1 METILMALONSKA ACIDEMIJA.....	27
2.3.3.2 HIPERHOMOCISTEINEMIJA.....	27
2.3.3.3 MEGALOBLASTNA ANEMIJA.....	28
2.3.3.4 NEVROPATIJA KOBALAMINA.....	28

2.3.4	PREHRANSKA DOPOLNILA Z VITAMINOM B12 .....	28
2.3.5	PSEVDOVITAMIN B12 .....	29
2.3.6	TOPLOTNA OBDELAVA VITAMINA B12 .....	29
2.3.7	VITAMIN B12 Z EPIDEMIOLOŠKE STRANI .....	29
2.3.8	POMANJKANJE VITAMINA B12 PRI ŽIVALIH.....	30
2.3.8.1	POMANJKANJE PRI REJNIM ŽIVALIH.....	30
2.3.8.2	POMANJKANJE VITAMINA B12 PRI DOMAČIH LJUBLJENČKIH .....	30
3	PREHRANSKA DOPOLNILA.....	30
3.1	PRAVILNIK O PREHRANSKIH DOPOLNILIH.....	31
4	NAMEN DELA .....	32
4.1	CILJI.....	32
4.1.1	ANKETNI VPRAŠALNIK .....	32
4.1.2	HPLC.....	32
4.2	HIPOTEZE .....	33
5	METODE DELA.....	34
5.1	ANKETNI VPRAŠALNIK .....	34
5.2	KROMATOGRAFIJA.....	34
5.2.1	Visokotlačna tekočinska kromatografija (High Pressure Liquid Chromatography) – HPLC.....	34
5.2.1.1	SESTAVA HPLC .....	34
5.2.2	HPLC na Gimnaziji Novo mesto .....	36
5.3	PREGLED TRGA S PREHRANSKIMI DOPOLNILI B12 V SLOVENIJI.....	36
6	EKSPERIMENTALNI DEL .....	37
6.1	POTEK DELA .....	37
6.2	PRIPOMOČKI IN KEMIKALIJE .....	37
6.2.1	PRIPOMOČKI.....	37
6.2.2	KEMIKALIJE.....	38
6.2.3	STANDARDA.....	38
6.3	KROMATOGRAFSKA METODA.....	38
6.3.1	POGOJI KROMATOGRAFIJE .....	38
6.3.1.1	CIANOKOBALAMIN.....	38
6.3.1.2	METILKOBALAMIN.....	39
6.4	PRIPRAVA TOPILA IN MOBILNE FAZE.....	39

6.4.1	TOPILO .....	39
6.4.1.1	DOLOČANJE CIANOKOBALAMINA.....	39
6.4.1.2	DOLOČANJE METILKOBALAMINA.....	39
6.4.2	MOBILNA FAZA.....	40
6.4.2.1	DOLOČANJE CIANOKOBALAMINA.....	40
6.4.2.2	DOLOČANJE METILKOBALAMINA.....	40
6.5	PRIPRAVA HPLC .....	40
6.6	PRIPRAVA RAZTOPIN STANDARDA.....	40
6.6.1.1	STANDARD CIANOKOBALAMIN .....	40
6.6.1.2	STANDARD METILKOBALAMIN .....	41
6.7	PRIPRAVA VZORCEV PREHRANSKIH DOPOLNIL .....	42
6.7.1	PRIPRAVA VZORCEV TABLET 1 .....	43
6.7.2	PRIPRAVA VZORCEV TABLET 2 .....	44
6.7.3	PRIPRAVA VZORCEV TABLET 1 ZA PREVERJANJE TOČNOSTI METODE .....	44
6.7.4	PRIPRAVA VZORCEV PRŠILA 1 .....	45
6.7.5	PRIPRAVA VZORCEV PRŠILA 2 .....	45
6.7.6	PRIPRAVA VZORCEV PRŠILA 3.....	45
7	REZULTATI IN INTERPRETACIJA.....	46
7.1	ANKETNI VPRAŠALNIK .....	46
7.1.1	ANALIZA PRVEGA VPRAŠANJA.....	46
7.1.2	ANALIZA DRUGEGA VPRAŠANJA .....	46
7.1.3	ANALIZA TRETJEGA VPRAŠANJA .....	47
7.1.4	ANALIZA ČETRTEGA VPRAŠANJA.....	47
7.1.5	ANALIZA PETEGA VPRAŠANJA.....	47
7.1.6	ANALIZA ŠESTEGA VPRAŠANJA.....	47
7.1.7	ANALIZA SEDMEGA VPRAŠANJA .....	48
7.1.8	ANALIZA OSMEGA VPRAŠANJA.....	48
7.1.9	ANALIZA DEVETEGA VPRAŠANJA.....	49
7.1.10	ANALIZA DESETEGA VPRAŠANJA .....	49
7.1.11	ANALIZA ENAJSTEGA VPRAŠANJA.....	50
7.1.12	ANALIZA DVANAJSTEGA VPRAŠANJA .....	50
7.1.13	ANALIZA TRINAJSTEGA VPRAŠANJA.....	50
7.1.14	ANALIZA ŠTIRINAJSTEGA VPRAŠANJA .....	51

7.1.15	ANALIZA PETNAJSTEGA VPRAŠANJA.....	51
7.2	HPLC DOLOČANJE VITAMINA B12.....	52
7.2.1	LINEARNOST CIANOKOBALAMINA.....	52
7.2.2	LINEARNOST METILKOBALAMINA.....	53
7.2.3	PONOVLJIVOST INJICIRANJA.....	54
7.2.4	PONOVLJIVOST METODE.....	55
7.2.5	TOČNOST METODE.....	56
7.2.1	ANALIZA PREHRANSKIH DOPOLNIL .....	57
7.2.1.1	ANALIZA TABLET .....	57
7.2.1.2	ANALIZA PRŠIL.....	59
7.2.2	STABILNOST STANDARDA.....	62
7.2.3	STABILNOST VZORCEV PREHRANSKIH DOPOLNIL.....	64
7.2.3.1	CELE TABLETE NA SVETLOBI .....	64
7.2.3.2	ZDROBLJENE TABLETE NA SVETLOBI .....	66
7.3	PREHRANSKA DOPOLNILA Z VITAMINOM B12 NA SLOVENSKEM TRGU .....	67
8	RAZPRAVA.....	70
9	ZAKLJUČEK.....	74
10	VIRI .....	75
11	VIRI SLIK.....	80
12	PRILOGE.....	81
12.1	ANKETNI VPRAŠALNIK.....	81
12.2	SPECIFIKACIJI STANDARDOV.....	87
12.2.1	CIANOKOBALAMIN.....	87
12.2.2	METILKOBALAMIN.....	88

## KAZALO SLIK

Slika 1: Zdrav prehranski krožnik (prirejeno po (Ribič, 2009)) .....	14
Slika 2: Sestava zrna polnozrnatega žita (Tina Drobtinka, 2022) .....	15
Slika 3: Strukturna formula vitamina B12 in njegovih delnih struktur, po katerih se njegove oblike med sabo razlikujejo. 1: 5-deoksiadenozilkobalamin; 2: metilkobalamin; 3: hidroksokobalamin; 4: sulfitokobalamin; 5: cianokobalamin ali vitamin B12 (Watanabe, Fumio, 2007).....	19
Slika 4: Absorpcija in cirkulacija vitamina B12 v človeškem telesu (prirejeno po (Green, in drugi, 2017, 3)).....	20
Slika 5: Formula metilkobalamina (Wikipedia, 2022).....	21
Slika 6: Formula adenzilkobalamina (MedChemExpress, 2022) .....	22
Slika 7: Formula hidroksokobalamina (Wikipedia, 2022) .....	22
Slika 8: Injekcija hidroksokobalamina (Wikimedia common, 2022) .....	23
Slika 9: Formula cianokobalamina (Wikipedia, 2022) .....	23
Slika 10: S koliko grami živila zadostimo 100 % priporočenega dnevnega vnosa vitamina B12? (Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2022) .....	26
Slika 11: Sestava HPLC sistema.....	35
Slika 12: Osnovni primer kromatograma z oznakami (Dr. Deepak, 2022).....	35
Slika 13: HPLC na Gimnaziji Novo mesto .....	36
Slika 14: Premica linearnosti cianokobalamina .....	52
Slika 15: Linearnost metilkobalamina.....	53
Slika 16: "peak" metilkobalamina pri analizi standarda .....	54
Slika 17: Prvotni kromatogram analize vzorca tablete 1 .....	57
Slika 18: Prvotni kromatogram analize vzorca tablete 2 .....	58
Slika 19: Kromatogram vzorca tablete 1 .....	59
Slika 20: Kromatogram vzorca tablet 2 .....	59
Slika 21: Prvotni kromatogram vzorca pršila 1 .....	59
Slika 22: Prvotni kromatogram vzorca pršila 2 .....	60
Slika 23: Prvotni kromatogram vzorca pršila 3 .....	60
Slika 24: Kromatogram vzorca pršila 1 .....	61
Slika 25: Kromatogram vzorca pršila 2 .....	61
Slika 26: Kromatogram vzorca pršila 2 z dodanim standardom za identifikacijo odziva metilkobalamina .....	62
Slika 27: Kromatogram pršila 3 .....	62
Slika 28: Viale s standardom, izpostavljene svetlobi za 48 h .....	62
Slika 29: Kromatogram standarda po 48 h v temi v hladilniku.....	63
Slika 30: Kromatogram standarda po 48 h v temi v sušilniku na 25 °C .....	64
Slika 31: Kromatogram standarda po 48 h na svetlobi pri sobni temperaturi.....	64
Slika 32: Cele tablete 1 po 48 urah na svetlobi (zgoraj) v primerjavi z originalnimi (spodaj) .....	65
Slika 33: Kromatogram vzorca celih tablet, izpostavljenih svetlobi 48 h.....	65
Slika 34: Kromatogram vzorca celih tablet 2, izpostavljenih svetlobi 48 h.....	66

Slika 35: Kromatogram PD 1, izpostavljenega svetlobi za 48 ur v obliki zdrobljenih tablet ..... 67

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Primerjava vsebnosti beljakovin v stročnicah in mesu .....	16
Tabela 2: Referenčne vrednosti vitamina B12 glede na življenjsko obdobje.....	24
Tabela 3: Vsebnost vitamina B12 v nekaterih živilih .....	25
Tabela 4: Delež pomanjkanja vitamina B12 pri prebivalstvu različnih držav po svetu .....	<b>Napaka! Zaznamek ni definiran.</b>
Tabela 5: Rezultati linearnosti cianokobalamina.....	52
Tabela 6: Rezultati linearnosti metilkobalamina .....	53
Tabela 7: Rezultati ponovljivosti prvih treh paralelk vzorca tablet 1.....	55
Tabela 8: Rezultati ponovljivosti drugih treh paralelk vzorca tablet 1 .....	55
Tabela 9: Povprečje vseh šestih paralelk vzorca.....	55
Tabela 10: Rezultati analize samih vzorcev in izračun koncentracije metilkobalamina v njih.....	56
Tabela 11: Izračun izkoristka med dobljenimi in dodanimi koncentracijami standarda – točnosti metode.....	56
Tabela 12: Deklarirane vsebnosti analiziranih prehranskih dopolnil.....	57
Tabela 13: Rezultati analize tablet.....	57
Tabela 14: Rezultati ponovne analize tablet.....	58
Tabela 15: Rezultati analize pršil .....	59
Tabela 16: Sprememba aree pri standardih, izpostavljenih različnim zunanjim pogojem .....	63
Tabela 17: Rezultati analize celih tablet prehranskih dopolnil, hranjenih 48 h na svetlobi .....	65
Tabela 18: Rezultati analize zdrobljenih prehranskih dopolnil, izpostavljenih svetlobi .	66
Tabela 19: Pregled prehranskih dopolnil na trgu.....	68

## KAZALO GRAFIKONOV

Grafikon 3: Tortni diagram starosti udeležencev .....	46
Grafikon 4: Tortni diagram starosti udeležencev .....	46
Grafikon 5: Časovna opredelitev veganskega prehranjevanja posameznika.....	47
Grafikon 6: Prikaz zavedanja možnosti pomanjkanja hranil med anketirano populacijo	48
Grafikon 7: Grafikon težav, povezanih s primanjkljajem vitamina B12.....	49
Grafikon 8: Kraj nakupa prehranskih dopolnil .....	50
Grafikon 9: Kakovost prehranskih dopolnil B12.....	51

## 1 UVOD

Ljudje se velikokrat prepozno začnemo zavedati pomena lastnega zdravja in dobrega počutja. A če se je družba v preteklosti manj posvečala zdravemu načinu življenja, smo danes obdani z mediji, ki temu področju namenjajo veliko pozornosti. Slišimo, vidimo in preberemo lahko številne nasvete za zdrav življenjski slog, recepte za zdravo prehrano. In četudi se ti napotki v različnih virih, sploh na družbenih omrežjih, pogosto izključujejo, lahko z malce truda najdemo prave usmeritve za bolj zdravo in polnovredno življenje.

Več kot se na tržišču pojavlja nezdrave, pred pripravljene in industrijsko predelane hrane, bolj se znanost in posledično različni mediji ukvarjajo z zdravo prehrano.

Poraja se nam veliko vprašanj, kakšna hrana je zares zdrava, tako med znanstveniki kot med ljudmi obstajajo zelo različna in nasprotujoča si mnenja o tem tako zelo pomembnem področju. Tudi vsebina uravnotežene prehrane se je z razvojem spreminjala in ob porastu bolezni sodobnega življenja (srčno-žilne bolezni, rakava obolenja, alergije) že nekaj časa velja, da naj bo na naših krožnikih precej manj mesnih in več zelenjavnih živil.

Vzporedno s temi dognanji je pomembno tudi večje zavedanje o ekoloških problemih, varovanju okolja in preživetju vedno številčnejšega človeštva. Zaradi vsega navedenega je v zadnjih desetletjih vedno več ljudi, ki se izogibajo ali povsem odrečejo hrani živalskega izvora, ker želijo živeti bolj zdravo ali pa sledijo etičnim in ekološkim načelom.

Sami opažava, da je v zadnjem času, tudi med mladimi, velik porast tistih, ki ne uživajo mesne hrane. Zdi se, da je postalo nekako trendovsko, da se čim bolj izogibaš živilom živalskega izvora ali postaneš kar strikten vegan, zato se nama je zdelo zanimivo, da bi raziskali zdravstveno ozadje striktno veganske prehrane, ki je včasih bolj posledica neracionalnega sledenja trendom kot rezultat zrele odločitve.

Osredotočili sva se na nutricionistiko tega zdravstvenega ozadja, predvsem na pomanjkljivosti veganske prehrane. Med prebiranjem literature o veganstvu sva namreč ugotovili, da je med nekaterimi minerali in vitamini, ki lahko manjkajo v veganski prehrani, še posebej pomemben vitamin B12. Ta je zaradi mnogih razlogov nujen za pravilno delovanje našega telesa in procesov v njem.

V pričujoči raziskovalni nalogi bova predstavili zgradbo vitamina B12, različne oblike te kompleksne molekule, zdravstvene težave, ki se lahko pojavijo, če ne uživamo živil z zadostno količino tega vitamina, zgodovino razvoja veganstva in razloge, ki ljudi prepričajo v takšen način življenja. Vanjo bova vključili tudi rezultate ankete, ki sva jo izvedli med vegani, ter rezultate analize nekaterih prehranskih dopolnil z vitaminom B12. Analize sva izvedli z napravo HPLC, podale pa so nama nekaj zanimivih rezultatov. V nalogi bova predstavili najpomembnejše dele zakonodaje, ki omenjajo pogoje glede trženja prehranskih dopolnil. Na koncu bova predstavili tudi pregled slovenskega trga s prehranskimi dopolnili z vitaminom B12, ki nama je potrdil znana dejstva, namreč, da je ta trg reguliran podobno kot trg s hrano, zato na njem najdemo številne pomanjkljivosti v

deklaracijah izdelkov. Tako mogoče ni presenetljivo, da nama certifikati izdelkov, za katere sva zaprosili, razen za enega, niso bili na voljo.

Med pripravo in predvsem izvajanjem raziskovalne naloge so se nama porajala številna nova vprašanja, iz katerih sva sestavili hipoteze, ki jih bova na koncu naloge tudi ovrednotili.

## **2 TEORETIČNI DEL**

### **2.1 VEGANSTVO**

Vegetarijanstvo je način prehranjevanja, ki se izogiba živalskim produktom. Znotraj tega ločimo lakto-ovo vegetarijanstvo, za katero je značilno izogibanje mesu, ne pa tudi ostalim živalskim produktom, lakto-vegetarijanstvo, ki označuje brezmesno prehrano, v kateri prav tako ni jajc, ovo-vegetarijanstvo, za katero je dodatno značilno izogibanje mlečnim izdelkom, ter striktno veganstvo. Poznamo tudi alternativo vegetarijanstvu, imenovano frutarijanstvo, pri katerem posameznik uživa le sadne izdelke. (Inštitut za nutricionistiko, 2022)

#### **2.1.1 RAZLOGI ZA VEGANSTVO**

Veganski način življenja pripomore k manjšemu trpljenju živali, ponuja možnost zmanjšanja človeškega odtisa na okolje, prav tako pa omogoča dobro telesno pripravljenost in lahko zmanjšuje tveganje za razvoj kroničnih bolezni. Ljudje se za veganstvo odločajo iz različnih razlogov, prevladujoči pa so:

- etični
- zdravstveni
- kulturni. (vegan.com, 2022)

##### **2.1.1.1 PORAST VEGETARIJANSTVA**

Začel se je šele v zadnjega pol stoletja, saj so pred tem v vsesplošnem pomanjkanju, ki je spremljalo obe svetovni vojni in leta po njih, ljudem prišli prav vsi viri hrane, ne glede na izvor. Od šestdesetih let dalje se je blaginja povečala, ljudje v razvitem svetu niso več trpeli za pomanjkanjem hrane, znanstveniki pa so z raziskavami začeli spreminjati tako svoje kot tudi mnenje ljudi glede brezmesne prehrane. Ugotovitve raziskav so pokazale, da morda ne bi bilo slabo, če bi ljudje začeli uživati manjše količine mesa ali pa ga sploh ne bi uživali. To ideologijo so še posebej utrdili hipiji, ki so svoj vrhunec doživeli 1969 na Woodstocku. Po koncu njihovega obdobja je med ljudmi spet zavladal materializem in vrnilo so se k vsestranski, tudi z mesom bogati prehrani. (Time, 2022)

##### **2.1.1.2 PORAST VEGANSTVA**

V zadnjem času je veganstvo v porastu. Kar 10 % svetovne populacije se je odločilo meso izključiti iz svojih prehranjevalnih navad. (Nguyen, 2017) V članku časopisa Delo avtorica

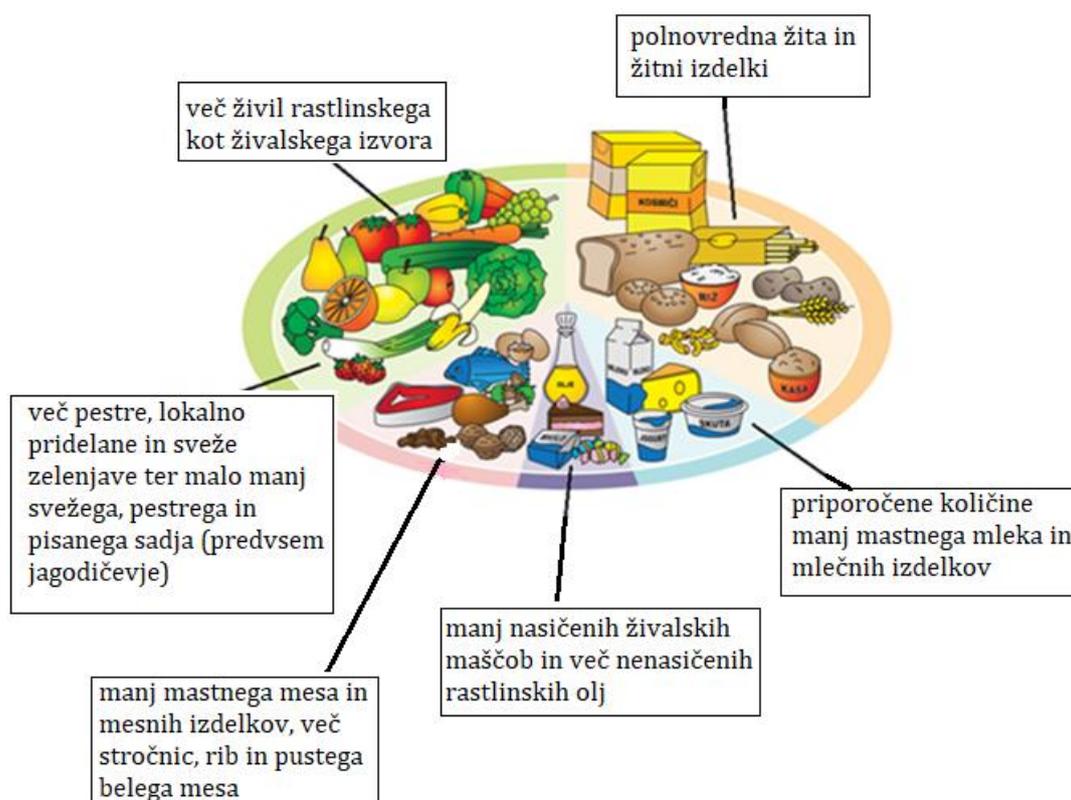
navaja, da se je v letih od 2014 do 2017 v Ameriki število veganov povečalo za 600 %. (Pust, 2020).

Sprva se je veganstvo v razvitem delu sveta razširilo zaradi ideologije o pravicah živali, ki je poleg živil živalskega izvora zavračala tudi nošenje oblačil iz krzna, volne ipd. Čez čas se je veganstvo povečevalo zaradi zdravstvenih pa tudi trendovskih razlogov. Prav zaradi trendovskega vidika se zanj odločajo tudi ljudje, ki jih etično ali zdravstveno ozadje ne zanima. Izpostaviti velja izraelski Tel Aviv, ki je znan kot ena izmed prestolnic veganstva, saj temu življenjskemu slogu sledi kar 5 % prebivalstva. Je pa tam veganstvo del kulture, ki simbolično izhaja tudi iz pravic živali. (Nguyen, 2017)

## 2.1.2 PREHRANA VEGANOV

### 2.1.2.1 Uravnotežena prehrana vsejedca

Uravnoteženo prehrano vsejedca lahko ponazorimo s shemo zdravega krožnika (Slika1), kjer največji delež predstavlja zelenjava in precej manjši del beljakovine živalskega izvora (z manj mastnega mesa in mesnih izdelkov ter več rib in stročnic), pozornost pa posveča tudi sveži in lokalno pridelani zelenjavi in sadju ter polnovrednim žitom.



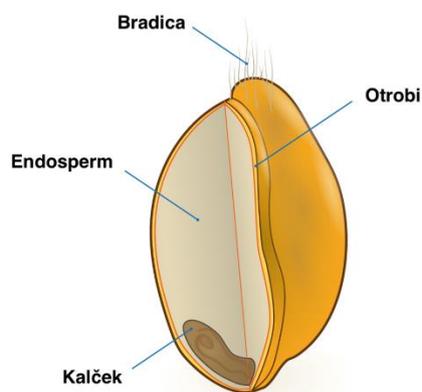
Slika 1: Zdrav prehranski krožnik (prirejeno po (Ribič, 2009))

Zdrav krožnik pomeni uživati tudi manj slano hrano, omejiti sladkor v prehrani, zaužiti dovolj tekočine (od 1,5 do 3 litre) ter omejiti uživanje alkohola. (Ribič, 2009)

Priporočila za sestavo obrokov obsegajo razporeditev na krožniku. Polovica zdrave porcije kosila ali večerje na krožniku zajema zelenjavo (kuhano, dušeno ali pečeno na žaru) in sadje (priporočljivo raznolika po barvi in vrsti plodov), četrtnina krožnika je namenjena beljakovinskim živilom, druga četrtnina škrobnim živilom. (Javno zdravje, 2021)

Še več napotkov za sestavo zdravju koristnega krožnika podaja Harvard Chan Home. S polovice zdravega krožnika s sadjem in zelenjavo je izključen krompir, zaradi negativnega vpliva na raven krvnega sladkorja.

Na četrtnini krožnika s škrobnimi živilom morajo biti polnozrnati izdelki, ki imajo veliko višjo hranilno vrednost kot rafinirana žita. Polnozrnata žita namreč ohranijo svojo večslojno semensko ovojnico oz. otrobe, ki so bogati z vlakninami, fenolnimi spojinami in so pomemben vir vitaminov B2 in B3 ter mineralov: železa, cinka, fosforja in magnezija.



Slika 2: Sestava zrna polnozrnatega žita (Tina Drobtinka, 2022)

Med preostalo četrtnino z beljakovinami morajo prevladovati ribe, oreščki in stročnice. Priporočljivo je omejeno uživanje rdečega mesa in predelanih mesnin, kot so hrenovke in salame.

Med maščobami naj bodo zastopana rastlinska olja, ki jih je vendarle treba uživati zmerno. Pomembna je tudi njihova izbira. Med zdrava rastlinska olja sodijo oljčno, koruzno, sončnično in ogrščično. Priporočeno je izogibanje hidrogeniranim oljem, saj le ta vsebujejo trans maščobe. (Harvard T. H. Chan, 2022)

#### 2.1.2.2 Prehrana veganov

V osnovi se uravnotežena prehrana veganov in vegetarijancev drastično ne razlikuje od prehrane vsejedcev. Razlike se pojavijo pri zadoščanju telesne potrebe po beljakovinah, ki jih vsejedci pogosto črpajo iz mesnih in nasploh živalskih izdelkov. Te je mogoče nadomestiti z uživanjem oreščkov in stročnic, ki pa po vsebnosti beljakovin nekoliko zaostajajo za mesnimi izdelki. V primerjavi z mesnimi živilom so stročnice bogate z vlakninami, nenasičenimi maščobami in prehransko zelo pomembnimi folati. Z izjemo

soje vsebujejo zelene stročnice malo maščob (približno 1 %), med katerimi ni nasičenih maščobnih kislin in holesterola. (Elin Rööös, 2022)

Tabela 1: Primerjava vsebnosti beljakovin v stročnicah in mesu

<b>ŽIVILO</b>	<b>VELIKOST PORCIJE (G)</b>	<b>VSEBNOST BELJAKOVIN (G)</b>
<b>BELI FIŽOL</b>	190	15
<b>RJAVI FIŽOL</b>	190	17
<b>BOB</b>	170	13
<b>ZELENA LEČA</b>	150	14
<b>PIŠČANČJI FILE, OCVRT</b>	100	27
<b>KOS GOVEDINE, KUHAN</b>	100	26
<b>SVINJSKI VRAT, OCVRT</b>	100	21
<b>JETRCA, OCVRTA</b>	100	13

(Elin Rööös, 2022)

Čeprav bi z živili rastlinskega izvora načeloma lahko nadomestili vnos beljakovin z živili živalskega izvora pa si le-ta niso enakovredna. Na beljakovine živalskega izvora je namreč vezan vitamin B12.

## **2.2 HRANILA**

### **2.2.1 GLAVNA HRANILA**

#### **2.2.1.1 VLAKNINE**

Vlaknine predstavljajo neprebavljiv del našega obroka, zato tudi nimajo kalorične vrednosti. Delimo jih na v vodi topne in netopne. Topne vlaknine zvišujejo viskoznost črevesnega okolja, kot npr. guar gumi, netopne pa so bolj grobe, primer je celuloza.

Priporočena količina zaužitih vlaknin za odrasle je 30 g dnevno, pridobimo pa jih z uživanjem sadja, zelenjave in polnozrnatih žit (samo iz rastlinskih živil).

Vlaknine varujejo črevesje, vplivajo na obnavljanje in delovanje črevesne sluznice, znižujejo holesterol in dajejo daljši občutek sitosti. (Pokorn, Vlaknine, 1997)

#### **2.2.1.2 MAŠČOBE**

Maščobe oz. trigliceridi so kemijsko uvrščene med lipide, ki so slabo ali popolnoma netopni v vodi. So estri glicerola in maščobnih kislin. Delimo jih na nasičene (»slabe«) in nenasičene (»dobre«).

Nasičene maščobne kisline najdemo v izdelkih živalskega izvora, označbo »slabe« pa so si pridobile, ker višajo raven holesterola v krvi in povečujejo tveganje za razvoj srčno-žilnih bolezni, kapi ter nekaterih oblik raka.

Nenasičene maščobne kisline najdemo večinoma v izdelkih rastlinskega izvora. Znižujejo raven holesterola v krvi, stabilizirajo srčni ritem, pomirjajo vnetja itd. Pri uživanju maščob se je treba zavedati, da je bolj kot količina pomembna vrsta maščobe.

Za telo izredno slabe so trans maščobe, ker zvišujejo raven slabega (LDL) in znižujejo raven dobrega holesterola (HDL), s tem zelo povečajo tveganje za srčni infarkt, kap in diabetes. Slabo vplivajo tudi na imunski sistem. (Belitz H.D., 2009)

### 2.2.1.3 VITAMINI IN MINERALI

Vitamini in minerali sodelujejo pri obnavljanju kože, skrbijo za pravilno delovanje živčevja, možganov in imunskega sistema. Skozi življenje se naše potrebe po določenem vitaminu spreminjajo, potrebe po vitaminih se razlikujejo tudi med skupinami ljudi, npr. kadilci, nosečnice itd.

Vitamine delimo na vitamine, topne v maščobah (A, D, E, K) in topne v vodi (B, C).

Vitamini, topni v maščobah, se nalagajo v tkivih, zato povečanje njihove količine lažje vodi do zastrupitev. Vodotopni vitamini se izločajo z urinom, zato se je z njimi težje zastrupiti, hitreje pa utrpimo njihovo pomanjkanje.

Minerali so makroelementi, natrij, kalcij, kalij, magnezij, klor, fosfor in žveplo, ter mikroelementi, kot so železo, jod, baker, cink, kobalt, krom, selen, fluor, mangan in molibden. Pomanjkanje mineralov se pojavi precej redkeje kot pomanjkanje vitaminov, potrebe so večje le pri določenih bolezenskih stanjih (driska), v nosečnosti in pri dojenju. (Pokorn, Vitamini in minerali, 1997)

### 2.2.1.4 BELJAKOVINE

Beljakovine oz. proteini so organske molekule, sestavljene iz manjših gradbenih enot, aminokislin. Beljakovine so za človeka pomembne, saj sestavljajo tkiva.

Naše telo je sposobno samo proizvajati potrebne beljakovine, potrebno je vnesti le nujne gradnike. Aminokislino delimo na esencialne in neesencialne.

Med esencialne aminokislino uvrščamo histidin, izolevcin, levcin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan in valin.

Odrasli moški morajo zaužiti približno 59 g beljakovin na dan in ženske 47 g/dan, s starostjo pa se potreba zmanjšuje (vsakih 10 let v povprečju za 1 g). Nekaj več beljakovin potrebujejo otroci in nosečnice.

Veliko beljakovin vsebujejo živila živalskega izvora (mleko, mlečni izdelki, jajca, meso in morski sadeži), med katerimi je izjema med. Veliko beljakovin vsebujejo tudi stročnice (fižol, grah, bob, leča, čičerika ...) in oreščki (orehi, lešniki, indijski in brazilski oreščki, makadamija ...). (Pokorn, 1997)

### 2.2.1.5 OGLJIKOVI HIDRATI

Ogljikove hidrate delimo na monosaharide, oligosaharide (od 3 do 9 monosaharidnih enot) in polisaharide (več kot 9 monosaharidnih enot).

Med monosaharidi so najbolj pomembni in poznani glukoza, fruktoza, manoza in galaktoza, znani disaharidi pa so saharoza, laktoza in maltoza. Sladkorji v koncentraciji nad 60 % delujejo kot konzervansi.

Med polisaharide uvrščamo škrob, prehranske vlaknine (celuloza) in druge. Škrob pri rastlinah predstavlja rezervno snov, pri človeku pa t. i. rezistentni škrob uravnava prebavo in daje občutek sitosti. Zgrajen je iz dveh polimerov, amiloze in amilopektina, oba sestavlja monosaharid glukoza.

Poznamo tudi sladkorne alkohole, npr. sorbitol, ki ga v majhnih količinah najdemo v sadju.

Polnovredna prehrana naj bi vključevala veliko ogljikovih hidratov, ki vsebujejo škrob, prehranske vlaknine in esencialne hranljive snovi. Enostavni sladkorji naj ne bi prispevali več kakor 10 % dnevnega energijskega vnosa, saj imajo visok glikemični indeks.

Za človeka niso esencialni, predstavljajo pa enostavno obliko energije. Najdemo jih v sadju, kuhinjskem sladkorju, medu, žitih, krompirju, stročnicah itd.

(Boyer, 2005)

### 2.2.2 POMANJKANJE HRANIL PRI VEGANIH

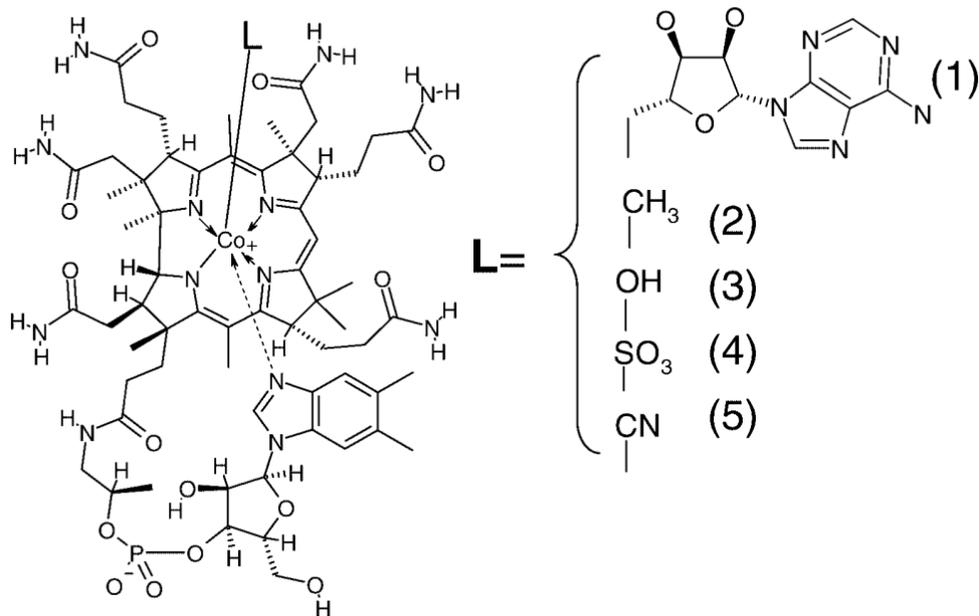
Kljub navideznim prednostim veganske prehrane pogosto prihaja do primanjkljaja hranil, kot so:

- **vitamin B12:** glavni viri so živila živalskega izvora,
- **vitamin D:** poglavitni viri so rumenjaki, jetrca in ribe,
- **cink:** glavni viri so polnozrnata žita, posebno oves, oreščki in stročnice. Problem stročnic in oreščkov je fitinska kislina (zaloga fosforja), ki z minerali tvori soli fitate, ki se težko absorbirajo (Tesařová, 2021); stročnice in žita je dobro namakati ali tudi fermentirati, saj s tem razgradimo fitinsko kislino, ki bi v črevesju onemogočala absorpcijo mineralov,
- **železo:** v obliki, uporabni za človeka, ga najdemo v mesu, glavni viri za vegane pa so stročnice, tofu, semena in listna zelenjava,
- **maščobne kisline omega-3:** dokozaheksaenojsko kislino (DHA) in eikozapentanojsko kislino (EPA) najdemo v ribah in morskih sadežih, v manjših količinah pa tudi v jajcih in mesu, v veganski prehrani prevladuje predvsem alfa-linolenska kislina (ALA), ki jo najdemo v lanenih semenih in olju, v bučnih in konopljinih semenih ter olju, orehah in olju, v repičnem olju, chia semenih,
- **kalcij:** najbogatejši viri kalcija so mleko, jogurt, sir, vegani pa se zanašajo predvsem na mak, oreščke in zelenjavo,
- **jod:** mineral se naravno nahaja predvsem v ribah, morski hrani in mleku, veganom pa glavne vire predstavljajo jodirana sol, nekatero sadje in zelenjava ter morske alge,
- **kreatin:** telo vsejedcev pridobi kreatin iz izdelkov živalskega izvora (meso, ribe, mleko), glavni viri za vegane so prehranska dopolnila,
- **karnozin:** na njegovo koncentracijo v telesu vpliva vnos beta-alanina, ki ga običajno najdemo v mesu in jajcih, glavni viri za vegane so prehranska dopolnila. (Tesařová, 2021)

## 2.3 VITAMIN B12

### 2.3.1 MOLEKULA VITAMINA B12

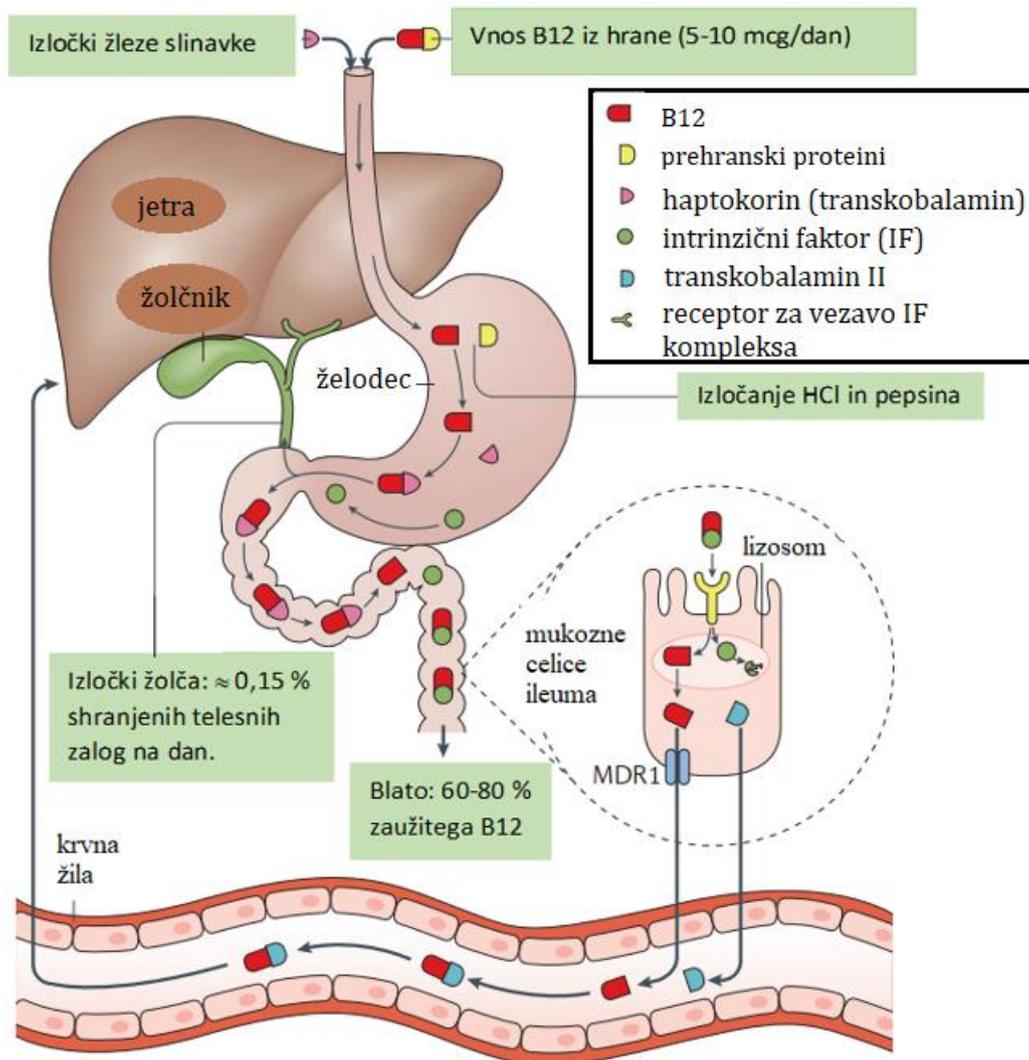
Vitamin B12 je največja in najbolj kompleksna molekula med vsemi vitamini. Iz kemijske strukture je razvidno, da vsebuje kovino kobalt, na katero so vezani različni ligandi (Slika 2), vse oblike vitamina B12 imenujemo kobalamini. (Watanabe, Fumio, 2007)



Slika 3: Strukturna formula vitamina B12 in njegovih delnih struktur, po katerih se njegove oblike med sabo razlikujejo. 1: 5-deoksiadenozilkobalamin; 2: metilkobalamin; 3: hidroksokobalamin; 4: sulfitokobalamin; 5: cianokobalamin ali vitamin B12 (Watanabe, Fumio, 2007)

Vitamin B12 je v vodi topen kompleks, ki sta ga že leta 1948 kot prva izolirala ameriški kemik Karl August Folkers in britanski kemik Alexander R. Todd. Ključen je za delovanje mnogih mikroorganizmov in živali, vključno z ljudmi. Pri bolj razvitih živalih igra pomembno vlogo pri razvoju rdečih krvničk. Nužen je tudi za nekatere druge procese na celični ravni.

Vitamin B12 se v kislem okolju želodca s proteolizo sprosti iz nosilnih proteinov v hrani živalskega izvora. V želodcu se veže na haptokorin (transkobalamin), prenašalno beljakovino. Le ta nastane v žlezi slinavki in zaščiti vitamin B12 pred kislom razgradnjo. V dvanajstniku se spremeni pH, kar povzroči razgradnjo haptakorina in vezavo B12 na intrinzični faktor (IF), ki je 50 kDa velika beljakovina, glikoprotein, ki jo tvorijo celice želodčne stene. Nastane kobalamin IF kompleks, odporen na proteolitično razgradnjo in potuje do distalnega ileuma (končni odsek tankega črevesa), kjer se absorbira s pomočjo specifičnih receptorjev na sluznici ščetkastega obrobka (receptorska endocitoza). IF je prenašalni protein do celic, podobno kot transferin za železo. Kobalamin IF kompleks, ki vstopi, vezan na receptorje, v mukozne celice ileuma, kjer se IF kompleks razgradi, kobalamin pa prenese na drug transportni protein, transkobalamin (TC) II. Ta preide v krvni obtok, njegov razpolovni čas je le 1 uro, nato ga prevzamejo celice jeter, kostnega mozga in drugih organov. Od tam preide v kri, vezan na transkobalamin I (TCI), ki ima daljši razpolovni čas (nekaj dni). Večina B12 je shranjena v jetrih (približno 2 mg) in še 2 mg drugje v telesu. Ob upoštevanju minimalne dnevne porabe, bi se pomanjkanje pokazalo šele čez 3 do 6 let, če bi se absorpcija prenehala (zaradi bolezenskega stanja ali pomanjkanja vitamina B12 v prehrani). (Green, in drugi, 2017, 3)



Slika 4: Absorpcija in cirkulacija vitamina B12 v človeškem telesu (prirejeno po (Green, in drugi, 2017, 3))

Vitamin B12 najdemo zgolj v hrani živalskega izvora, ne pa tudi v rastlinah, zato se lahko pri veganih, ki ne uživajo živil živalskega izvora (meso, ribe, jajca, mleko) ali z vitaminom B12 obogatene hrane, po nekaj letih razvije pomanjkanje tega vitamina, če ga v svojo prehrano ne dodajajo s prehranskimi dopolnili. (Karl August Folkers, 2022)

Pomanjkanje vitamina B12 pri ljudeh lahko povzroči neustrezen razvoj brbončic na zgornji strani jezika, ki mu dajejo značilno grobo teksturo (t. i. papillae linguales) in so nujne za razlikovanje različnih okusov. Posledice pomanjkanja so pogosto slabo delovanje črevesja, ki se kaže v obliki prebavnih motenj, včasih tudi kot zaprtje ali diareja (driska). Zelo resne posledice, ki se lahko razvijejo, so okvare nekaterih senzoričnih in motoričnih področij v hrbtenjači, ki lahko ostanejo stalne. Začetne težave se kažejo kot otrplost in ščemenje prstov na rokah ali nogah, kar se, če ni ustreznega zdravljenja, nadaljuje v nestabilno hojo in paralizo. (Karl August Folkers, 2022)

Vzroki za pomanjkanje vitamina B12 so lahko poleg prehranjevalnih navad in kirurških posegov (npr. odstranitev dela ali celega želodca) tudi bolezenska stanja, kot sta

malabsorpcija ali slaba absorpcija vitamina B12 iz črevesja (posledica neustreznega delovanja želodca, trebušne slinavke ali tankega črevesa) in perniciozna anemija (avtoimunska vnetje želodca). Obe bolezenski stanji sta vnetni in ju skupno imenujemo atrofični gastritis. (Higdon, 2000)

Simptomi, po katerih bi lahko sklepali, da trpimo za pomanjkanjem vitamina B12, so:

- megaloplastna anemija (premajhno število rdečih krvnih teles),
- različni nevrološki simptomi (npr. otrple ali mravljinčaste roke ali še bolj pogosto, noge),
- gastrointestinalni simptomi (gladek jezik, izguba apetita, zaprtje) in drugi.

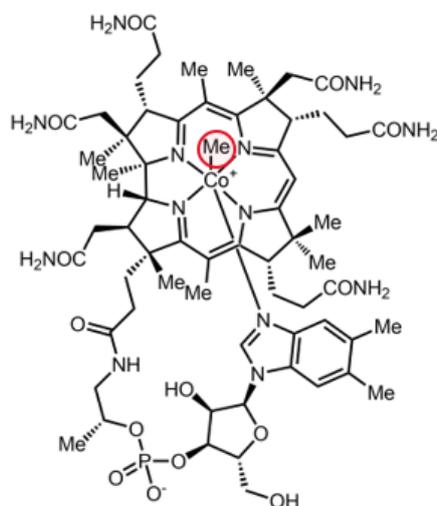
Rizična skupina za pomanjkanje B12 so poleg veganov predvsem vsi starejši od 50 let, ki se jim svetuje, da namesto 2,5 µg jemljejo 100–400 µg vitamina B12 dnevno, v obliki prehranskih dopolnil. (Higdon, 2000)

### 2.3.1 Oblike vitamina B12 in biorazpoložljivost

Izmed vseh kobalaminov, vitamina B12 in delnih struktur (ligandov) se v naravni obliki pojavljajo metilkobalamin (Slika 5), adenzilkobalamin (Slika 6) in hidroskobalamin (Slika 7). Vse oblike so biološko identične in so se v kliničnih študijah pri ljudeh s pomanjkanjem vitamina B12 izkazale kot učinkovite za izboljšanje njegovega statusa. Poleg omenjenih oblik je najbolj znan analog še cianokobalamin (Slika 9). Gre za sintetično obliko vitamina B12, ki jo uporabljajo v nekaterih prehranskih dopolnilih in z vitaminom B12 obogateni hrani, v telesnih tkivih pa ga najdemo le v sledovih, kot posledico vnosa cianida, npr. s cigaretim dimom. (Christiana Paul, 2022)

#### Metilkobalamin

V metilkobalaminu je na kobalt vezana metilna skupina. Predstavlja najbolj biorazpoložljivo obliko vitamina B12, porablja se predvsem v jetrih, možganih in živčevju. Je naravnega izvora in ga najdemo v živalskih produktih. (ivboost.uk, 2022) (Christiana Paul, 2022)

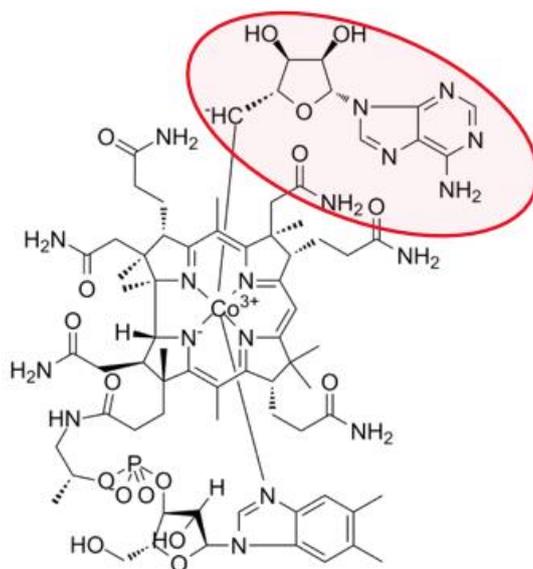


Slika 5: Formula metilkobalamina (Wikipedia, 2022)

### Adenozilkobalamin

Tudi adenozilkobalamin je, kot metilkobalamin, naravnega izvora in je koencimska oblika vitamina B12, njegovo delovanje je povezano z delovanjem metilkobalamina.

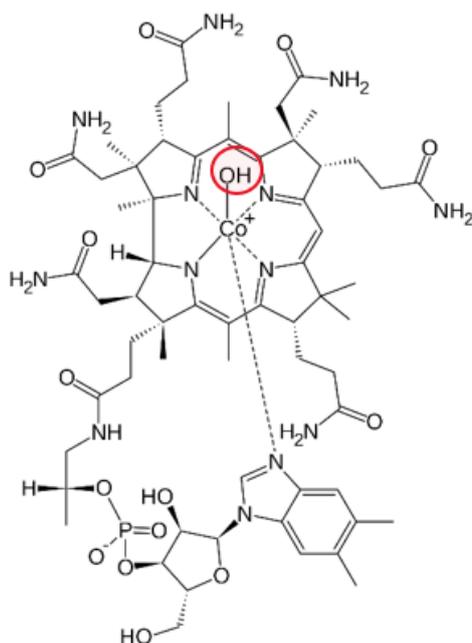
Posebej pomemben je za ohranjanje mitohondrijev, ki jim pomaga pri metabolizmu. Je tudi ključna sestavina miozinskih ovojníc, ki obdajajo nevrone. (ivboost.uk, 2022) (Christiana Paul, 2022)



Slika 6: Formula adenozilkobalamina (MedChemExpress, 2022)

### Hidroksokobalamin

Hidroksokobalamin obliko vitamina B12 naravno proizvajajo bakterije v prebavnem traktu, med razgradnjo hranil. Lahko je ustvarjen tudi umetno, v laboratoriju, kjer ga pridobivajo s pomočjo mikroorganizmov. (ivboost.uk, 2022) (Christiana Paul, 2022)



Slika 7: Formula hidroksokobalamina (Wikipedia, 2022)



Pregledane študije dokazujejo, da so vse oblike B12, pridobljene s prehranskimi dopolnili ali živili, reducirane na jedro molekule kobalamina, ki se pretvori v znotrajcelične aktivne oblike: metilkobalamin (MeCbl) in adenzilkobalamin (AdCbl), v razmerju, na katerega oblika zaužitega B12 ne vpliva.

Na splošno biološko uporabnost pa lahko poleg oblike zaužitega B12 vplivajo tudi dejavniki, kot so: gastrointestinalna patologija, starost, genetika itd. (Christiana Paul, 2022)

### 2.3.2 REFERENČNE VREDNOSTI B12 IN DNEVNI VNOS

V Sloveniji so referenčne vrednosti potrebnega vnosa B12 v različnih starostnih obdobjih navedene v dokumentu NIJZ, predstavljene so v Tabeli 2. (Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2022)

Za Evropo priporočila o vitaminu B12 predpisuje Evropska agencija za varnost hrane (European Food Safety Authority – EFSA). V dokumentu Scientific Opinion on Dietary Reference Values for cobalamin (vitamin B12) najdemo vse potrebne podatke o vitaminu B12, podprte z relevantnimi študijami in raziskavami. Med drugim so zapisani tudi priporočeni dnevni odmerki za različne starostne skupine. Podatki se ne razlikujejo od navedenih v dokumentu slovenskega NIJZ. (Authority, 2015)

*Tabela 2: Referenčne vrednosti vitamina B12 glede na življenjsko obdobje*

STAROSTNA SKUPINA	STAROST	PRIPOROČENI DNEVNI VNOS (µg)
NOVOROJENCI/DOJENČKI	0–6 in 7–12 mesecev	0,4 in 0,5
OTROCI	1–3 let	1,5
	4–6 let	2,0
	7–9 let	2,5
	10–12 let	3,5
	13–14 let	4,0
MLADOSTNIKI	15–18 let	4,0
ODRASLI	19–65 let	4,0
STAREJŠI	> 65 let	4,0
NOSEČNICE		4,5
DOJEČE MATERE		5,5

(Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2022)

Po priporočilih NIJZ, ki so jih zapisali v dokumentu Referenčne vrednosti za energijski vnos in vnos hranil, dopolnjenem leta 2020 (Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2022) je priporočen dnevni vnos vitamina B12 za mladostnike nad 15 let in zdrave odrasle 4,0 µg. Na portalu Prehrana.si, kjer sta izvajalca programa Inštitut za nutricionistiko in NIJZ

(Inštitut za nutricionistiko, 2021) je naveden podatek 2,5 µg dnevno za EU, povzet po uredbi EU iz leta 2011 (Priloga XIII) (Uradni list Evropske unije, 2011), ki je še vedno v veljavi in še ni usklajen s podatki EFSA. (Authority, 2015) V omenjenem dodatku uredbe EU je tudi navedeno, da se referenčna vrednost 4,0 µg dnevno uporablja za načrtovanje prehrane in prehranskih smernic, medtem ko je za potrebe označevanja hranilne vrednosti živil še vedno v uporabi Priloga XIII uredbe EU. .

Na zadnji podatek se tako nanašajo tudi vsa prehranska dopolnila na slovenskem trgu, ko navajajo koliko odstotkov priporočenega dnevnega vnosa z dopolnilom zaužijemo.

Poleg uradnih podatkov, ki v EU še niso usklajeni, so na nekaterih spletnih straneh, namenjenih veganom, podane veliko večje količine, kot je priporočen dnevni vnos. Taka spletna stran je Vegan.si, ki navaja 2500 µg kot priporočen dnevni odmerek, kar je bistveno več, kot predpisujejo uradni dokumenti. (Sušnik, 2016)

Vitamin B12 je pomemben za delovanje človeškega telesa, zato si moramo zadosten vnos zagotoviti s pravilno prehrano ali prehranskimi dopolnili.

Prehranski dodatki za vegane včasih vsebujejo modrozeleno cepljivke ali cianobakterije, ki večinoma vsebujejo t. i. psevdovitamin B12 (poglavje 2.3.5), ki je za človeka neuporaben. V dopolnilih mora biti vitamin B12 dodan v eni izmed aktivnih oblik, kot so cianokobalamin, hidroskobalamin, metilkobalamin ali 5-deoksiadenozilkobalamin. (Inštitut za nutricionistiko, 2021)

Tabela 3: Vsebnost vitamina B12 v nekaterih živilih

<b>ŽIVILO</b>	<b>VITAMIN B12 (µg/100 g živila)</b>	<b>PDV* (%)</b>	<b>PDV** (%)</b>
telečja jetra	60	2400	1500
svinjska jetra	39	1560	975
školjke	8	320	200
tuna	4	172	100
postrv šarenka	4	151	100
losos	3	116	75
svinjina	2	79	50
govedina	2	79	50
jajce	2	76	50
sir	2	62	50
polenovka (trska)	1	48	25
šunka	0,9	37	22,5

puranje meso	0,5	21	12,5
--------------	-----	----	------

\*PDV – delež priporočenega dnevnega vnosa za odrasle, preračunan na podatek 2,5 µg po še vedno veljavni uredbi EU iz leta 2011 (Priloga XIII) (Uradni list Evropske unije, 2011)

\*\* PDV – delež priporočenega dnevnega vnosa za odrasle, ki je preračunan na podatek 4,0 µg po uradnih navedbah EFSE (Evropa) in NIJZ (Slovenija). (Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2022)



Slika 10: S koliko grami živila zadostimo 100 % priporočenega dnevnega vnosa vitamina B12? (Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2022)

### 2.3.3 POMANJKANJE VITAMINA B12

Količine vitamina B12 v telesu se s starostjo zmanjšujejo. Na njegovo zadostno količino morajo biti še posebej pozorne nosečnice in doječe matere (pomanjkanje vitamina B12 pri dojenčkih vodi v nevrološke, presnovne in hematološke okvare in motnje), bolniki, ki boleajo za Crohnovo boleznijo ali razjedami, in bolniki, ki jemljejo, na recept predpisana, zdravila za epilepsijo, putiko in kronično slabo prebavo. Absorpcijo B12 zmanjšuje tudi pitje alkohola. (Aleš Koščak, 2022)

Lažje oblike pomanjkanja vitamina B12 se kažejo kot:

- utrujenost in oslabelost,
- zaprtje,
- izguba apetita,
- depresija,
- slabši spomin,
- odrevenelost in mravljinčenje v okončinah.

Hujše oblike pomanjkanja se indicirajo med drugim v megaloblastni anemiji (2.3.3.3) in nevropatiji (okvarah živčnega sistema) (2.3.3.4). (Prehrana.si, 2022)

Četudi posledice pomanjkanja vitamina B12 znamo diagnosticirati in večinoma ustrezno zdraviti, še vedno ne poznamo natančno biokemijskega mehanizma, ki je odgovoren za nastanek nekaterih obolenj. Vemo, da je zdravljenje megaloblastne anemije in nevropatije (okvare živčnega sistema) uspešno z vitaminom B12, točnega vzroka teh bolezni pa še ne znamo opisati. (Yamada, 2013)

Opisane so nekatere najbolj poznane bolezenske posledice, ki lahko nastanejo zaradi dolgotrajnega nezadostnega vnosa vitamina B12.

#### 2.3.3.1 METILMALONSKA ACIDEMIJA

Spada med redke razvojne bolezni, značilna je za novorojence, znaki se pojavijo kmalu po rojstvu. Nastane kot posledica zmanjšanega ali odsotnega delovanja mitohondrijskega encima, kaže pa se v dveh oblikah: blažji, ki se odziva na zdravljenje z vitaminom B12, in težji, ki je na takšno zdravljenje neodzivna. Najpogostejši klinični simptomi so motnja zavesti s ketoacidozo, bruhanjem, dehidracijo, hipotonijo in zaostankom v razvoju. Posledica bolezni je slabši kognitivni razvoj otroka, od organskih sistemov pa prizadene ledvice (kronična ledvična bolezen). (Tanšek, 2018)

#### 2.3.3.2 HIPERHOMOCISTEINEMIJA

Bolezen, pri kateri gre za nenormalno visoko raven homocisteina (žveplo vsebujoča aminokislina). Stanje z močno povečanimi koncentracijami te aminokislina vodi v nastanek srčno-žilnih obolenj. V zadnjih desetletjih se zelo preučuje, saj naj bi bilo povezano z različnimi hudimi obolenji: z Alzheimerjevo boleznijo, shizofrenijo in osteoporozo. (Yamada, 2013) Med vzroki za nastanek bolezenskega stanja (visok vnos beljakovin rdečega mesa, kajenje, debelost, nekatera zdravila) je pomanjkanje vitaminov B6, B12 in folne kisline. (Valens, 2021)

### 2.3.3.3 MEGALOBLASTNA ANEMIJA

Do megaloblastne anemije pride zaradi nepravilne sinteze DNK, ki jo med drugimi vzroki povzroči primanjkljaj vitamina B12. (Yamada, 2013)

V obdobju, ko vzroka bolezni zdravniki še niso poznali in je bila ta smrtonosna, so megaloblastni anemiji rekli perniciozna anemija. Gre za pomanjkanje notranjega faktorja (glikoprotein, ki nastane pri sekreciji starševskih celic želodčne sluznice), ki nastane kot posledica pomanjkanja vitamina B12. (Nagalla, 2021)

Če je megaloblastna anemija posledica pomanjkanja vitamina B12, se lahko pojavijo številni simptomi:

- bled rumenkast podton kože,
- vnet in rdeč jezik,
- ustne razjede,
- parestezija (mravljinčenje, občutek zbadanja z iglicami po koži),
- spremembe v hoji in premikanju nasploh,
- motnje vida,
- razdražljivost,
- depresija,
- spremembe v razmišljanju, čutenju in obnašanju,
- nazadovanje v mentalnih sposobnostih, npr. pri pomnjenju, presoji in razumevanju. (NHS, 2022)

### 2.3.3.4 NEVROPATIJA KOBALAMINA

Gre za bolezensko stanje z nenormalnim delovanjem perifernega živčnega sistema. (Yamada, 2013) Zajema sklop blagih do težjih, pogosto nevroloških, simptomov pomanjkanja vitamina B12 (spremembe refleksov, slabo delovanje mišic, težave s spominom). (Yamada, 2013)

## 2.3.4 PREHRANSKA DOPOLNILA Z VITAMINOM B12

Poleg tistih ljudi, ki morajo prehranska dopolnila z vitaminom B12 jemati iz zdravstvenih razlogov, jih strokovnjaki priporočajo predvsem starejšim ljudem, vegetarijancem, veganom, nosečnicam in materam, ki so v obdobju dojenja in sledijo vegetarijanski oz. veganski dieti.

Če prehranska dopolnila z vitaminom B12 jemljemo v priporočenih odmerkih, ni bojazni za neželene učinke. Tudi če občasno zaužijemo večji odmerek kot 4 µg, ni nič narobe, saj naše telo absorbira le takšno količino, kakršno potrebuje, preostanek pa se izloči skozi izločala.

Če večji odmerek, kot je priporočeno, zaužijemo večkrat, lahko pride do posledic, kot so:

- glavobol,
- slabost in bruhanje,
- driska,
- utrujenost in šibkost,
- parestezija (mravljinčenje) v dlaneh in stopalih. (Osebje, 2021)

#### 2.3.4.1.1 INTERAKCIJE VITAMINA B12 Z DRUGIMI SNOVMI

Sočasno uživanje prehranskih dopolnil z vitaminom B12 in nekaterih drugih substanc ali zdravilnih učinkovin lahko privede do zmanjšane absorpcije vitamina B12. Te substance so:

- aminosalicilna kislina: uporablja se za zdravljenje želodčnih težav,
- kolhicin: protivnetno zdravilo za zdravljenje putike,
- metformin: zdravilo pri sladkorni bolezni,
- zdravilne učinkovine, inhibitorji protonske črpalke (omeprazol, lanzoprazol),
- askorbinska kislina (vitamin C). (Clinic, Mayo Clinic, 2021)

#### 2.3.5 PSEVDOVITAMIN B12

Psevdovitamin B12 se nahaja v jedilnih algah, kot so spirulina, nori alge, klorela ... Drži, da je v njih res velika količina vitamina B12, a je za sesalce neuporaben, saj je oblika vitamina B12, najdena v algah, za nas biološko neaktivna. Znanstveniki so preizkušanja opravili na podganah, ki se jim je sicer raven vitamina B12 v telesu močno zvišala, a te oblike vitamina telo kasneje ni moglo pretvoriti v nič uporabnega. Iz tega razloga prepričanje, da lahko vegani oz. vegetarijanci vitamin B12 pridobijo iz alg ali prehranskih dopolnil iz alg, ni dobro. (Watanabe, 2002)

#### 2.3.6 TOPLOTNA OBDELAVA VITAMINA B12

Vitamin B12 je občutljiv na toplotno obdelavo. Raziskava na univerzi Cambridge je pokazala, da se pri toplotni obdelavi hrane, ki vsebuje vitamin B12, njegova vsebnost zmanjša za 0–35 %. Največ vitamina B12 naj bi se izgubilo pri posredni toplotni obdelavi (kondukcijski, radiacijski, konvekcijski). (Margaret E. Gregory H. B., 2009)

#### 2.3.7 VITAMIN B12 Z EPIDEMIOLOŠKE STRANI

Največji problem s pomanjkanjem vitamina B12 imajo v državah, v katerih sta deleža prebivalcev vsejedcev in vegetarijancev skoraj enaka. To so predvsem azijske države. Neka druga raziskava pa je pokazala, da je splošno veliko pomanjkanje vitamina B12 med prebivalstvom tudi v karibskih državah. (Tekin Guney, 2022)

Tabela 4: Delež pomanjkanja vitamina B12 pri prebivalstvu različnih držav po svetu (Tekin Guney, 2022)

DRŽAVA	SODELUJOČI	DELEŽ POMANJKANJA
NIZOZEMSKA	N = 73, starost: 9–15 let	41 %
ZDA	N = 49, starost: 55 let	47 %
NEMČIJA	N = 71, starost: 51–53 let	58 %
ETIOPIJA	N = 99, starost: 27–28 let	62 %
ZDRUŽENO KRALJESTVO IN SEVERNA IRSKA	N = 65, starost: 42–43 let	40 %
OMAN	N = 96, starost: 50 let	67,5 %
KITAJSKA	N = 119, starost: 55 let in več	42 %
HONGKONG	N = 113, starost: 55 let in več	81 %
INDIJA	N = 78, starost: 27–55 let	75 %
NOVA ZELANDIJA	N = 41, starost: 11–22 mesecev	85,4 %
NORVEŠKA	N = 73, starost: 915 let	21 %

### **2.3.8 POMANJKANJE VITAMINA B12 PRI ŽIVALIH**

#### **2.3.8.1 POMANJKANJE PRI REJNIH ŽIVALIH**

Kaže se kot oblika pomanjkanja kobalta v prehrani živali in ker so živali prehrana velike večine prebivalstva, je pomembno, da vemo, kakšne so živali, če trpijo za pomanjkanjem vitamina B12.

**POSLEDICE POMANJKANJA VITAMINA B12 PRI OVCAH IN GOVEDU:**

- zmanjšan apetit,
- anemija,
- luskasta ušesa.

**ZNAKI POMANJKANJA VITAMINA B12 PRI OVCAH IN GOVEDU:**

- solzne oči, vlažna in slaba volna pod očmi, odpadanje volnenega kožuha (ovce)
- slab, grob kožuh in manjša tvorba mleka (govedo). (Erickson, 2019)

#### **2.3.8.2 POMANJKANJE VITAMINA B12 PRI DOMAČIH LJUBLJENČKIH**

Do pomanjkanja vitamina B12 lahko pride tudi pri hišnih ljubljenceh, pri katerih vitamin B12 sodeluje pri procesih na medcelični in telesni ravni in je njegovo delovanje podobno delovanju v človeškem telesu, zato moramo biti pozorni na znake, kot so:

- pomanjkanje energije,
- ščetinasta dlaka,
- izguba telesne mase,
- zmanjšan apetit,
- dolgočasen kožuh oz. kožuh brez tipičnega sijaja,
- driska,
- letargija,
- psihološka zdolgočasnost,
- drugi nevrološki problemi.

Pomanjkanje vitamina B12 pri domačih živalih se lahko zdravi oralno ali intravensko z injekcijami. Večina veterinarjev največkrat svetuje intravensko obliko zdravljenja. (Kingsdale, 2022)

## **3 PREHRANSKA DOPOLNILA**

Prehranska dopolnila so živila, ki predstavljajo koncentriran vir posameznih ali kombiniranih hranil, ki dopolnjujejo posameznikovo prehrano. Na voljo so v obliki kapsul, pastil, tablet, pršil in podobno.

Prehranska dopolnila niso zdravila! Njihov namen je dopolnjevati običajno prehrano in ne zdraviti ali preprečevati bolezenska stanja. Definicija zdravila po Zakonu o zdravilih – ZZdr-2 (Uradni list RS, št.17/14 in 66/19) se glasi: zdravilo je vsaka snov ali kombinacija snovi, ki so predstavljene z lastnostmi za zdravljenje ali preprečevanje bolezni pri ljudeh in živalih. (Ministrstvo za zdravje, 2022)

### **3.1 PRAVILNIK O PREHRANSKIH DOPOLNILIH**

Na podlagi tretjega odstavka 11. člena Zakona o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili (Uradni list RS, št. 52/00, 42/02 in 47/04 – ZdZPZ) je minister za zdravje izdal Pravilnik o prehranskih dopolnilih. (unije, Eur-Lex. Access to European Union Law, 2011)

- Pri predstavljanju prehranskih dopolnil se jim ne sme pripisovati zdravilnih lastnosti, jih navesti kot edini ustrezen vir hranil. Predstavljanje, oglaševanje in označevanje prehranskih dopolnil mora biti v skladu s predpisi.
- Prehranska dopolnila morajo biti označena kot »prehransko dopolnilo« in morajo imeti zabeležene naslednje podatke:
  - imena vrste vitaminov, mineralov ali snovi, ki so značilne za prehransko dopolnilo, ali podatek o naravi hranil in snovi;
  - priporočeno dnevno količino oz. odmerek prehranskega dopolnila;
  - Opozorilo: »Priporočene dnevne količine oz. odmerka se ne sme prekoračiti«;
  - navedbo: »Prehransko dopolnilo ni nadomestilo za uravnoteženo in raznovrstno prehrano«;
  - opozorilo: »Shranjevati nedosegljivo otrokom!«.

## **4 NAMEN DELA**

Že zelo dolgo naju zanima področje medicine in farmacije, zato nisva mogli zamuditi priložnosti, da se v ti dve področji vsaj malo poglobiva tudi z raziskovalno nalogo.

Ker se v vsakdanjem življenju vedno pogosteje srečujemo z vegani in njihovim življenjskim slogom, sva se želeli podrobneje seznaniti s prednostmi in slabostmi njihove prehrane. Želeli sva preveriti, ali je možno v človeški prehrani popolnoma nadomestiti živalske produkte in kako pomembno vlogo imajo pravzaprav v njej. Za naju izjemno pomemben vidik raziskovalne naloge je tudi potrditev primanjkljaja določenih hranil pri veganih, česar se mnogi ne zavedajo, in s tem povezane potrebe po njihovem nadomeščanju z uživanjem prehranskih dopolnil ter nazadnje ovreči prepričanje, da je človek po naravi rastlinojdec.

Pri določanju vsebnosti vitamina B12 v prehranskih dopolnilih sva se seznanili z delovanjem HPLC kromatografije in pravilnim branjem kromatogramov ter spoznali, katerim parametrom mora metoda zadostiti, da je ustrezna za določanje vsebnosti neke snovi. Bolje sva se spoznali tudi s kemijsko analitiko, ki zahteva izjemno pozornost in natančnost, ter z razumevanjem in branjem grafov in njihovo interpretacijo.

### **4.1 CILJI**

Pri zasnovi te naloge sva si zadali nekaj različnih ciljev. Ker sva jih dosegali z anketnim vprašalnikom in s praktičnim delom v laboratoriju, so cilji posameznega dela predstavljeni v podpoglavjih.

#### **4.1.1 ANKETNI VPRAŠALNIK**

Cilji:

- Preveriti zavedanje o primanjkljaju nekaterih hranil v prehrani veganske populacije.
- Izvedeti, koliko veganov je seznanjenih o posledicah pomanjkanja hranil v veganski prehrani.
- Raziskati prehranska dopolnila za nadomeščanje vitamina B12.
- Pridobiti informacije o najpogosteje izbranih prehranskih dopolnilih za nadomeščanje vitamina B12.
- Razumeti razloge za izbiro določenih prehranskih dopolnil in preveriti zavedanje o morebitnih slabostih določenih prehranskih dopolnil.

#### **4.1.2 HPLC**

Cilji:

- Preveriti stabilnost metilkobalamina kot najpogostejše učinkovine prehranskih dopolnil.
- Primerjati načine shranjevanja prehranskih dopolnil vitamina B12 pod različnimi zunanji vplivi.

- Preveriti deklarirano vsebnost vitamina B12 v prehranskih dopolnilih, najpogosteje omenjenih v anketi.
- Primerjati deklarirano in dejansko vsebnost B12 v prehranskih dopolnilih ter preveriti ustreznost prehranskih dopolnil z vitaminom B12 na slovenskem trgu.

## **4.2 HIPOTEZE**

Pri raziskovanju in izvajanju kromatografske analize HPLC sva postavili naslednje hipoteze:

- A) 90 % veganov se zaveda pomanjkanja B12 v njihovi prehrani.
- B) Vsaj polovici veganov je pomembna kakovost prehranskih dopolnil B12.
- C) Metoda je za metilkobalamin v širokem koncentracijskem območju linearna, daje ponovljive in točne rezultate.
- D) Standard metilkobalamin, izpostavljen svetlobi, se popolnoma razgradi, enako se razgradi tudi metilkobalamin v tabletah prehranskih dopolnil, če jih hranimo odprte na svetlobi.
- E) Rezultati analize vsebnosti učinkovine v prehranskih dopolnilih bodo primerljivi z deklariranimi vrednostmi, navedenimi na embalaži.
- F) Za prehranska dopolnila v lekarnah in specializiranih prodajalnah so na voljo dokumentacije proizvajalcev, ki zagotavljajo njihovo kakovost.

## 5 METODE DELA

Za praktični del najine raziskave sva se odločili izvesti anketo med vegani ter z njo poizvedeti, kako se ljudje z vegansko prehrano zavedajo pomanjkanja vitamina B12 in kako njegovo pomanjkanje v prehrani nadomeščajo.

Ker je na slovenskem trgu veliko število prehranskih dopolnil z vitaminom B12, sva se odločili v literaturi poiskati metodo HPLC za določanje tega vitamina, saj imamo na šoli aparaturo HPLC, na kateri sva se namenili preveriti vsebnost vitamina B12 v nekaterih prehranskih dopolnilih. Ob določitvi vsebnosti vitamina B12 sva želeli ugotoviti tudi, kako je standard in vzorec tablet obstojen, če ga izpostavimo različnim zunanjim dejavnikom.

Poleg praktičnega dela sva tudi preučili prehranska dopolnila, dostopna v Sloveniji.

### 5.1 ANKETNI VPRAŠALNIK

Anketa je način sistematičnega zbiranja podatkov, ki jih želimo pridobiti v izbrani populaciji, z namenom oblikovanja kvantitativnih opisov značilnosti širše populacije, ki jim izbrani preučevani člani pripadajo. (Robert M. Groves, 2009)

Za potrebe razumevanja veganskega vidika življenja sva izvedli anonimno anketo med vegani (včlanjenimi v Facebook skupino *Vegani, vegetarijanci, presnojedci*), rezultate katere predstavlja v nadaljevanju. Anketa je priložena v Prilogi.

### 5.2 KROMATOGRAFIJA

Kromatografija vključuje postopke separacije vzorca med mobilno fazo in stacionarno fazo. Začetnik kromatografije je Tswatt, ki je leta 1903 ločil pigmente s tekočinsko kolonsko kromatografijo.

#### 5.2.1 Visokotlačna tekočinska kromatografija (High Pressure Liquid Chromatography) – HPLC

HPLC-metode se imenujejo po tipih stacionarne faze. Normalna stacionarna faza je polarna, zato je mobilna faza nepolarna. Obrnjena ali reverzna stacionarna faza pa je nepolarna in mobilna za njo polarna. Katero stacionarno in katero mobilno fazo izberemo, je odvisno od vzorca. Izbiramo tako, da se vzorec v mobilni fazi najbolje raztaplja.

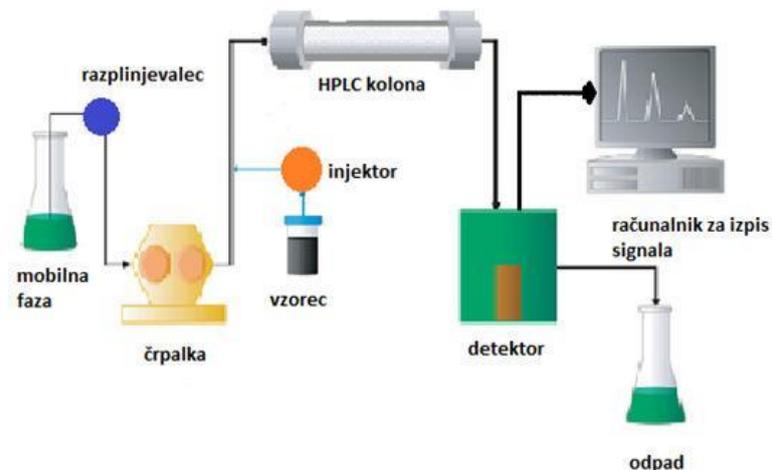
Za uspešno kromatografsko ločitev je potrebno napraviti kompromis med ločljivostjo med posameznimi vrhovi, hitrostjo separacije in kapaciteto kolone.

##### 5.2.1.1 SESTAVA HPLC

Osnovna oprema sistema HPLC je sestavljena iz več komponent:

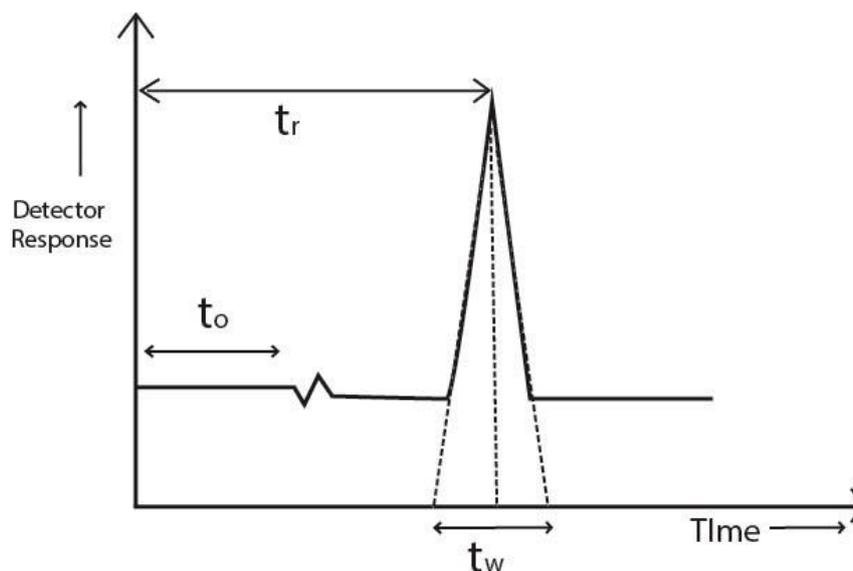
- rezervoar z mobilno fazo
- črpalka (pod tlakom potiska mobilno fazo skozi sistem),
- rezervoar za odpadna topila,

- razplinjevalec oz. degazer mobilne faze, ki je med rezervoarjem in črpalko,
- sistem za injiciranje (injicira vzorec na kromatografsko kolono),
- termostatisirana komora s kromatografsko kolono (v njej poteka ločevanje komponent vzorca),
- detektor (zazna komponente vzorca) in
- programska oprema za obdelavo vzorca.



Slika 11: Sestava HPLC sistema

KROMATOGRAM je graf, ki prikazuje potek metode. Pove nam, kdaj in v kakšni količini se preiskovana komponenta izrazi. Grafe preverjenih substanc primerjamo z grafi standardov. V našem primeru sva grafe vzorcev prehranskih dopolnil primerjali z grafi standarda metilkobalamina.



Slika 12: Osnovni primer kromatograma z oznakami (Dr. Deepak, 2022)

RETENZIJSKI ČAS ( $t_R$ ) je čas od začetka (t. i. mrtvega časa  $t_0$ ) do določenega vrha in predstavlja čas, ki ga komponenta potrebuje, da pride skozi kolono.

SIGNAL ali VRH, pogosto tudi »PEAK«, je krivulja, ki pokaže izraženost preiskovane komponente. Iz njegove površine oz. »AREE« lahko izračunamo koncentracijo komponente v vzorcu.

Za uspešno kromatografsko metodo je treba določiti parametre metode, ki se ne smejo spreminjati. Prvi parameter je pretok, ki je odvisen od volumna kolone in lahko z njim delno uravnavamo tlak v koloni, ki je zelo pomemben, saj vpliva na retenzijski čas signalov. Trajanje metode (t. i. »run time«) je pomembno, saj se morajo v tem času izraziti vsi signali na koloni ločenih snovi.

### 5.2.2 HPLC na Gimnaziji Novo mesto



Slika 13: HPLC na Gimnaziji Novo mesto

### 5.3 PREGLED TRGA S PREHRANSKIMI DOPOLNILI B12 V SLOVENIJI

Za analizo prehranskih dopolnil vitamina B12 sva nabavili štiri različna prehranska dopolnila v lekarni, enega v specializirani trgovini. Za izdelke sva tudi izrazili željo, da nama farmacevtka v lekarni priskrbi analizne certifikate proizvajalca.

Odločili sva se, da pregledava, kaj trg prehranskih dopolnil vsebuje, kako v poplavi izdelkov poskušajo trgovci prepričati kupce, da kupijo ravno njihov izdelek (Tabela 4).

## **6 EKSPERIMENTALNI DEL**

### **6.1 POTEK DELA**

- Pregled in zbiranje podatkov iz literature.
- Nabava standarda cianokobalamina.
- Izvedba ankete preko socialnega omrežja.
- Analiza ankete, predvsem odgovorov na vprašanja, ki zadevajo uporabo, znamke in način kupovanja prehranskih dopolnil z vitaminom B12.
- Nabava standarda metilkobalamina.
- Izbira metode za določanje kobalamina iz literature. Izbrana je bila glede na kemikalije, ki smo jih imeli na voljo, in enostavnost metode.
- Nabava prehranskih dopolnil in analiza na HPLC v šolskem laboratoriju.
- Pregled trga prehranskih dopolnil v Sloveniji in primerjava.

### **6.2 PRIPOMOČKI IN KEMIKALIJE**

#### **6.2.1 PRIPOMOČKI**

- HPLC-kromatograf Agilent 1100 series,
- kolona Agilent Eclipse XDB-C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 250 mm,
- vialne pokrovčke 2 ml,
- injekcijske brizge 1 ml,
- sušilnik Binder,
- filtri AGILENT PFTE 0,2  $\mu\text{M}$
- merilni valji (500 ml, 250 ml),
- čaše (25 ml, 50 ml, 100 ml),
- merilne bučke (10 ml, 20 ml, 50 ml, 100 ml),
- polnilne pipete (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml),
- plastične kapalke,
- spatule,
- terilnice s pestilom,
- ultrazvočna kopel Elmasonic P,
- pH-meter Vernier LabQuest,
- stojalo,

- analitska tehtnica Kern,
- tehtalne ladjice,
- magnetno mešalo Tehtnica Železniki MM-520,
- magneti za magnetno mešalo,
- stresalnik Phoenix RS – OS 5
- aluminijasta folija.

### 6.2.2 KEMIKALIJE

- deionizirana voda, pridobljena z uporabo ionskega izmenjevalca v kemijskem laboratoriju,
- kalijev dihidrogenfosfat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , > 99,9 %, Merck,
- kalijev dihidrogenfosfat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , > 95,5 %, Merck,
- kalijev hidrogenfosfat,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , > 98 %, Merck
- metanol,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , > 99,9 %, Riedel-de Haën,
- acetonitril,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , > 99,9 %, Riedel-de Haën,
- raztopina pufra pH = 9,0 za kalibracijo, FLUKA,
- raztopina pufra pH = 4,0 za kalibracijo, FLUKA,
- NaOH, 20-% raztopina.

### 6.2.3 STANDARDA

- vitamin B12 (cianokobalamin),  $\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{CoN}_{14}\text{O}_{14}\text{P}$ ,  $\geq 98$  %, Sigma – Aldrich (specifikacija v prilogi)
- metilkobalamin – Vitamin B12 analog,  $\text{C}_{63}\text{H}_{91}\text{CoN}_{13}\text{O}_{14}\text{P}$ , Sigma – Aldrich (specifikacija v prilogi)

## 6.3 KROMATOGRAFSKA METODA

### 6.3.1 POGOJI KROMATOGRAFIJE

#### 6.3.1.1 CIANOKOBALAMIN

Metoda je povzeta po strokovnem članku. (Gehad G. Mohamed, 2020)

**Metoda:** HPLC, izokratska elucija na reverzni fazi

**Kolona:** kolona Agilent Eclipse XDB-C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 250 mm

**Temperatura:** 25 °C

**Detekcija:** UV, 277 nm

**Mobilna faza:**

- fosfatni pufer (0,04 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) : acetonitril : metanol, 30 : 30: 40 (v : v : v)

**Pretok:** 1 ml/min

**Volumen injiciranja:** 20 µl

**Run time:** 5 min

**Programska oprema:** Chemstation, verzija 9.01

#### 6.3.1.2 METILKOBALAMIN

Metoda je povzeta po strokovnem članku. (Narmada P\*, 2013)

**Metoda:** HPLC, izokratska elucija na reverzni fazi

**Kolona:** kolona Agilent Eclipse XDB-C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm

**Temperatura:** 5 °C

**Detekcija:** UV, 210 nm

**Mobilna faza:**

- fosfatni pufer : metanol, 60 : 40 (v : v)

**Pretok:** 1 ml/min

**Volumen injiciranja:** 20 µl

**Run time:** 10 min

**Programska oprema:** Chemstation, verzija 9.01

## 6.4 PRIPRAVA TOPILA IN MOBILNE FAZE

### 6.4.1 TOPILO

#### 6.4.1.1 DOLOČANJE CIANOKOBALAMINA

Pri HPLC-kromatografiji za analizo cianokobalamina sva kot topilo uporabili metanol.

#### 6.4.1.2 DOLOČANJE METILKOBALAMINA

Pri analizi standardov in vzorcev z metilkobalaminom je kot topilo služila destilirana voda.

## 6.4.2 MOBILNA FAZA

### 6.4.2.1 DOLOČANJE CIANOKOBALAMINA

Najprej sva pripravili fosfatni pufer, tako da sva natehtali 4,68 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in ga raztopili v litru destilirane vode. Raztopini sva z 20-% raztopino NaOH uravnali pH na 7,0. Uporabili sva pH-meter, ki sva ga predhodno kalibrirali s pufroma pH 9,0 in 4,0.

Za HPLC-analizo vitamina B12 v obliki cianokobalamina je v literaturi kot najbolj učinkovita navedena mobilna faza v naslednji sestavi, podani v volumskih razmerjih:

fosfatni pufer : acetonitril : metanol = 30 : 30 : 40 (V : V : V)

### 6.4.2.2 DOLOČANJE METILKOBALAMINA

Fosfatni pufer sva pripravili tako, da sva natehtali 1,36 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 1,74 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  na liter destilirane vode.

Po izbranem viru sva mobilno fazo pripravili v razmerjih volumnov:

fosfatni pufer : metanol = 60 : 40 (V : V)

## 6.5 PRIPRAVA HPLC

Preden sva se lotili priprave vzorcev, sva zagnali HPLC, saj naprava potrebuje nekaj časa, da se segreje. Na računalniku sva odprli program Chemstation Online. Preden sva mobilno fazo spustili skozi kolono, sva jo nekaj časa črpali mimo črpalke (t. i. purge ventil), da sva se znebili zračnih mehurčkov. Po nekaj minutah sva purge ventil zaprli in mobilno fazo je črpalka začela črpati na kolono. Pozorno sva spremljali tlak na koloni. Ob dosegu ustreznega pretoka sva sistem kondicionirali toliko časa, da je bila bazna linija stabilna oz. ravna. V kondicionirani HPLC-sistem sva injicirali standarde ali vzorce ter dobili kromatogram, ki sva ga natisnili in shranili med rezultate.

## 6.6 PRIPRAVA RAZTOPIN STANDARDA

### 6.6.1.1 STANDARD CIANOKOBALAMIN

Za preverjanje linearnosti sva uporabili standarde z različnimi koncentracijami cianokobalamina v topilu metanol.

Pripravili sva raztopine standardov za linearnost (LIN0 do LIN5).

Osnovna raztopina za linearnost (LIN0): 30 mg standarda sva natehtali v 20,0-ml merilno bučko, ga raztopili v metanolu in dopolnili z metanolom do oznake (C = 1500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

Ostale raztopine so bile pripravljene z redčenjem osnovne in naslednjih raztopin za linearnost:

LIN1: redčenje 2,0 ml raztopine LIN0 / 10,0 ml metanola (C = 300 µg/ml)

LIN2: redčenje 1,0 ml raztopine LIN0 / 10,0 ml metanola (C = 150 µg/ml)

LIN3: redčenje 5,0 ml raztopine LIN1 / 20,0 ml metanola (C = 75 µg/ml)

LIN4: redčenje 1,0 ml raztopine LIN2 / 10,0 ml metanola (C = 15 µg/ml)

LIN5: redčenje 1,0 ml raztopine LIN3 / 10,0 ml metanola (C = 1,5 µg/ml)

#### 6.6.1.2 STANDARD METILKOBALAMIN

Ker se v prehranskih dopolnilih, izbranih za analizo, pojavlja metilkobalamin, sva pripravili tudi standarde metilkobalamina. Za preverjanje linearnosti sva pripravili raztopine standardov (LIN0 do LIN5) z različnimi koncentracijami metilkobalamina v topilu voda.

Osnovno raztopino standarda (LIN0) sva zaradi zelo majhne količine standarda metilkobalamina (še to večinoma na stenah embalaže) pripravili tako, da sva stehtali embalažo, ki je vsebovala standard metilkobalamina, potem standard iz embalaže z vodo kvantitativno prenesli v 50-ml merilno bučko, posušili embalažo in jo ponovno stehtali.

m (polne embalaže) = 8,6313 g

m (prazne embalaže) = 8,6152 g

m (standarda metilkobalamina) = 16,1 mg

osnovna raztopina standarda (LIN0): C = 0,322 mg/ml

Ostale raztopine so bile pripravljene z redčenjem osnovne in naslednjih raztopin za linearnost:

LIN1: redčenje 10,0 ml raztopine LIN0 / 20,0 ml vode (C = 161 µg/v)

LIN2: redčenje 5,0 ml raztopine LIN1 / 50,0 ml vode (C = 16,1 µg/ml)

LIN3: redčenje 10,0 ml raztopine LIN2 / 25,0 ml vode (C = 6,44 µg/ml)

LIN4: redčenje 2,0 ml raztopine LIN2 / 20,0 ml vode (C = 1,61 µg/ml)

LIN5: redčenje 5,0 ml raztopine LIN4 / 20,0 ml vode (C = 0,4025 µg/ml)

Osnovno raztopino standarda (LIN0) sva uporabili tudi za preverjanje ponovljivosti injiciranja, za preverjanje stabilnosti standarda in kot dodatek raztopinam vzorca tablet za preverjanje točnosti metode.

Za preverjanje ponovljivosti sva osnovno raztopino standarda injicirali šestkrat zaporedoma.

Za preverjanje stabilnosti standarda sva osnovno raztopino standarda v dveh temnih vialah dali v sušilnik pri 25 °C, dve v temnih vialah v hladilnik, dve pa v svetlih vialah pustili v sobnih razmerah. Te raztopine sva analizirali po 48 urah.

Za preverjanje točnosti metode sva ustrezno količino osnovne raztopine standarda (LIN0) dodali v raztopine vzorcev tablet.

## **6.7 PRIPRAVA VZORCEV PREHRANSKIH DOPOLNIL**

Pri pripravi vzorcev prehranskih dopolnil z učinkovino metilkobalamin sva se osredotočili na to, da je vsebnost vitamina B12 (v obliki metilkobalamina) v različnih prehranskih dopolnilih zares takšna, kot piše na embalaži (deklarirana vsebnost), ter da je vseeno, kako prehranska dopolnila, tako v obliki tablet (Jamieson in Now) kot v obliki pršil (Valens, Vegan Health in Boost), shranjujemo (pogoji shranjevanja niso zapisani na embalaži).

Za določanje količine učinkovine metilkobalamin sva uporabili HPLC-metodo, navedeno v poglavju Pogoji kromatografije (6.3.1.2).

Za analizo prehranskih dopolnil v obliki tablet sva za pripravo svežih vzorcev tablete vzeli iz originalno zaprte embalaže, za preverjanje stabilnosti učinkovine pa sva tablete izpostavili zunanjim dejavnikom (svetloba). Za pripravo raztopin vzorcev tablet sva najprej stehtali 20 tablet, iz katerih sva izračunali povprečno maso posamezne tablete. Zabeležili sva deklarirani vsebnosti učinkovine metilkobalamin v obeh vzorcih tablet (tablete 1 in tablete 2), navedeni na embalažah.

Za pripravo raztopin vzorca tablet sva tablete zdrobili in homogenizirali ter iz celotne mase zdrobljenih tablet pripravili tri paralelke raztopine vzorca tablet 1 in tablet 2. Za vzorec tablet 1 sva natehtali količine homogene zdrobljene mase, čim bližje povprečni masi tablete 1, za vzorec tablet 2 pa sva natehtali količine, čim bližje štirikratni povprečni masi tablete 2, in sicer zaradi izenačitve deklarirane vsebnosti metilkobalamina, ki je pri tabletah 2 štirikrat manjša kot pri tabletah 1. Vse raztopine vzorcev sva zaradi zaščite pred svetlobo hitro zavili z aluminijasto folijo.

Za analizo prehranskih dopolnil v obliki pršil sva vsakega od vzorcev (pršilo 1, pršilo 2 in pršilo 3) najprej dobro pretresli, naredili nekaj razprškov v odpad ter potem po 4 razprške usmerili v manjšo količino destilirane vode v čaši (gre za podjezično pršilo, ki se v vodi zelo hitro raztopi). Raztopino iz čaše sva nato kvantitativno s spiranjem prenesli v 100-ml merilno bučko in dopolnili z vodo do oznake. Vse raztopine vzorcev sva zaradi zaščite pred svetlobo hitro zavili z aluminijasto folijo.

### 6.7.1 PRIPRAVA VZORCEV TABLET 1

$m(20 \text{ tablet}) = 4,8918 \text{ g}$

povprečna masa tablete (p. m. tbl.) =  $0,24459 \text{ g} = 244,59 \text{ mg}$

deklarirana vsebnost metilkobalamina =  $1000 \mu\text{g}/\text{tableto}$

$m(\text{VZ1}) = 0,25310 \text{ g} = 253,10 \text{ mg}$

$m(\text{VZ2}) = 0,24810 \text{ g} = 248,10 \text{ mg}$

$m(\text{VZ3}) = 0,25110 \text{ g} = 251,10 \text{ mg}$

Za preverjanje ponovljivosti metode sva naslednji dan pripravili še tri paralelke vzorca tablet 1 (iz iste homogenirane mase, shranjene v temi).

$m(\text{VZ4}) = 0,23920 \text{ g} = 239,2 \text{ mg}$

$m(\text{VZ5}) = 0,25040 \text{ g} = 250,4 \text{ mg}$

$m(\text{VZ6}) = 0,25530 \text{ g} = 255,3 \text{ mg}$

10 celih tablet 1 sva pustili na svetlobi in čez 2 dni (48 ur) iz njih pripravili raztopino vzorca za preverjanje stabilnosti učinkovine v celih tabletah, hranjenih na svetlobi.

$m(\text{VZ1} - \text{stabilnost celih tablet}) = 248,40 \text{ mg}$

Na svetlobi sva pustili tudi zdrobljene tablete 1 in čez 48 ur iz njih pripravili raztopino vzorca za preverjanje stabilnosti učinkovine v zdrobljenih tabletah, hranjenih na svetlobi.

$m(\text{VZ1} - \text{stabilnost zdrobljenih tablet}) = 245,80 \text{ mg}$

Za ponovljeno analizo po preverjanju točnosti metode sva ponovno pripravili po tri paralelke vzorca tablet 1.

$m(20 \text{ tablet}) = 4,6636 \text{ g}$

povprečna masa tablete (p. m. tbl.) =  $0,23318 \text{ g} = 233,18 \text{ mg}$

deklarirana vsebnost metilkobalamina =  $1000 \mu\text{g} / \text{tableto}$

$m(\text{VZ1}) = 239,9 \text{ mg}$

$m(\text{VZ2}) = 234,2 \text{ mg}$

$m(\text{VZ3}) = 238,9 \text{ mg}$

### 6.7.2 PRIPRAVA VZORCEV TABLET 2

$m(20 \text{ tablet}) = 3,01919 \text{ g}$

$p. m. \text{ tbl} = 0,15096 \text{ g} = 150,96 \text{ mg}$

deklarirana vsebnost metilkobalamina = 250  $\mu\text{g}$  metilkobalamina/tableto

Zaradi primerljive deklarirane vsebnosti obeh tablet sva vzorce tablet 2 pripravili s tehtanjem mase zdrobljenih in homogeniziranih tablet, ki ustrezajo štirikratni deklarirani vsebnosti na tableto (1000  $\mu\text{g}$ ).

$m(\text{VZ1}) = 0,60392 \text{ g} = 603,92 \text{ mg}$

$m(\text{VZ2}) = 0,61000 \text{ g} = 610,00 \text{ mg}$

$m(\text{VZ3}) = 0,62249 \text{ g} = 622,49 \text{ mg}$

10 celih tablet vzorca tablet 2 sva pustili na svetlobi in po 48 urah iz njih pripravili raztopino vzorca za preverjanje stabilnosti učinkovine v celih tabletah, hranjenih na svetlobi.

### 6.7.3 PRIPRAVA VZORCEV TABLET 1 ZA PREVERJANJE TOČNOSTI METODE

Za preverjanje točnosti metode sva najprej pripravili tri paralelke raztopin vzorcev tablet 1. Tokrat sva stehali 10 celih tablet za izračun povprečne mase tablete. Tablete sva zdrobili in homogenizirali ter iz njih natehtali ustrezno količino mase v 50-ml merilne bučke, dodali vodo in dopolnili z vodo do oznake.

$m(\text{VZ1} - \text{točnost}) = 163,30 \text{ mg}$

$m(\text{VZ2} - \text{točnost}) = 163,70 \text{ mg}$

$m(\text{VZ3} - \text{točnost}) = 170,80 \text{ mg}$

Za osnovnimi vzorci tablet 1 sva pripravili še tri paralelke vzorcev z dodanim standardom. Vzorce homogeniziranih tablet 1 sva natehtali v 50-ml merilno bučko. V vzorce sva dodali določeno količino osnovne raztopine standarda s koncentracijo 322,0  $\mu\text{g/mL}$  (LIN0), dodali vodo in dopolnili z vodo do oznake.

$m(\text{VZ4} - \text{točnost}) = 163,30 \text{ mg} + 2,0 \text{ ml raztopine standarda LIN0}$

$m(\text{VZ5} - \text{točnost}) = 163,70 \text{ mg} + 5,0 \text{ ml raztopine standarda LIN0}$

$m(\text{VZ6} - \text{točnost}) = 170,80 \text{ mg} + 10,0 \text{ ml raztopine standarda LIN0}$

#### **6.7.4 PRIPRAVA VZORCEV PRŠILA 1**

deklarirana vsebnost metilkobalamina = 250 µg metilkobalamina/razpršek

Za vsako od treh paralelk vzorca pršila 1 sva odmerili 4 razprške, kar ustreza deklarirani količini metilkobalamina 1000 µg.

#### **6.7.5 PRIPRAVA VZORCEV PRŠILA 2**

deklarirana vsebnost metilkobalamina = 6 µg metilkobalamina/razpršek

Za vsako od treh paralelk vzorca pršila 2 sva odmerili 4 razprške, kar ustreza deklarirani količini metilkobalamina 24 µg.

#### **6.7.6 PRIPRAVA VZORCEV PRŠILA 3**

deklarirana vsebnost metilkobalamina = 300 µg metilkobalamina/razpršek

Za vsako od treh paralelk vzorca pršila 3 sva odmerili 4 razprške, kar ustreza deklarirani količini metilkobalamina 1200 µg.

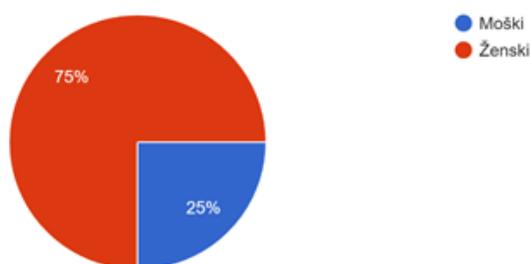
## 7 REZULTATI IN INTERPRETACIJA

### 7.1 ANKETNI VPRAŠALNIK

Anketni vprašalnik (priložen v Prilogi 1) je izpolnilo 65 prostovoljcev, ki so se prvotno opredelili kot vegani. Kar 5 od njih (7,7 %) je pri vprašanju o svoji prehrani povedalo, da iz nje niso popolnoma izločili živil živalskega izvora (jajca, mleko). To pomeni, da niso popolni vegani, zato njihovih odgovorov od petega vprašanja ankete naprej nisva upoštevali.

#### 7.1.1 ANALIZA PRVEGA VPRAŠANJA

Med prvotno 65 udeleženci ankete jih je na vprašanje odgovorilo 60, med njimi je bilo 75 % žensk in 25 % moških.

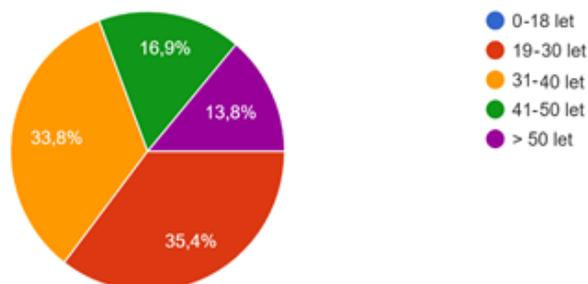


Grafikon 1: Tortni diagram starosti udeležencev

Večja zastopanost žensk med vegani je značilna tudi za druge, obsežnejše raziskave o veganski skupnosti (Tiran, 2016).

#### 7.1.2 ANALIZA DRUGEGA VPRAŠANJA

Anketirance sva želeli razdeliti v 5 starostnih skupin. Vsi so bili starejši od 18 let, prevladovali pa sta starostna skupina 19–30 let s 35 % ter starostna skupina 31–40 let s 34 %.



Grafikon 2: Tortni diagram starosti udeležencev

### 7.1.3 ANALIZA TRETJEGA VPRAŠANJA

Za potrebe popolnega razumevanja veganskega prehranjevanja naju je zanimalo, ali so anketiranci iz svoje prehrane izločili vsa živila živalskega izvora.

Kar 7,7 % udeležencev iz svoje »veganske prehrane« ni umaknilo živil živalskega izvora, kot so jajca, mleko in drugo, zato njihovih odgovorov na anketo od petega vprašanja naprej nisva vključili v analizo.

### 7.1.4 ANALIZA ČETRTEGA VPRAŠANJA

Zanimalo naju je tudi, katera živila živalskega izvora tisti, ki živil živalskega izvora niso povsem izključili iz prehrane, še vedno uživajo. Med odgovori so se pojavila domača jajca, med in brezlaktozno mleko.

### 7.1.5 ANALIZA PETEGA VPRAŠANJA

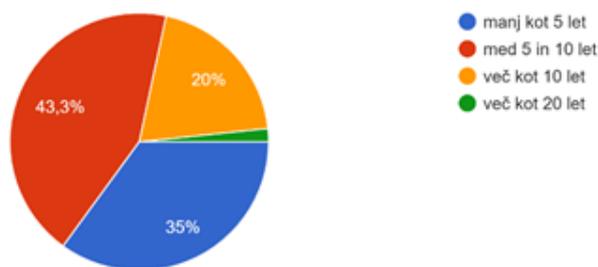
Pomemben vidik veganstva so razlogi za odločitev zanj. Nihče ni izbral odgovora, da je vegan že vse življenje. Izbrali pa so naslednje razloge:

- Imam moralno-etične razloge (odnos do živali ...): 76,7 %
- Vegan/ka sem zaradi zdravstvenih razlogov: 13,3 %
- Moji razlogi so povsem osebni: 5 %.

Med odgovori drugo so anketiranci kot razloge navedli tudi: okoljevarstvo in neprimeren odnos ljudi do okolja.

### 7.1.6 ANALIZA ŠESTEGA VPRAŠANJA

Zanimalo naju je, kako dolgo se anketiranci že prehranjujejo vegansko. Odgovorilo je 60 anketirancev. Rezultati so bili sledeči:



Grafikon 3: Časovna opredelitev veganskega prehranjevanja posameznika

Krepko prevladuje (s 43 %) skupina tistih, ki se vegansko prehranjujejo med 5 in 10 let, sledijo pa s 35 % tisti, ki živijo na tak način manj kot 5 let.

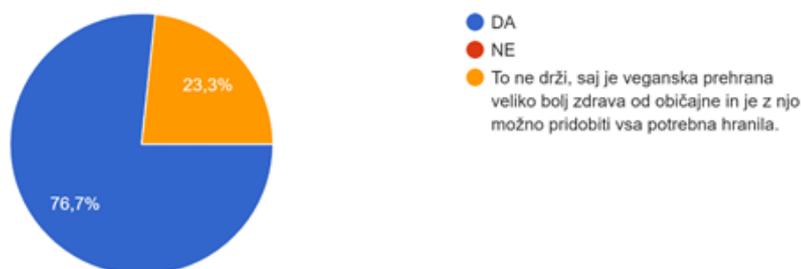
Rezultati kažejo na porast veganstva v zadnjem desetletju, kar sovpada tudi z rezultati raziskave, navedene pri prvem vprašanju. (Tiran, 2016) Pri slednji prevladujejo vegani, ki

tako živijo od 1 do 3 let, a ker je raziskava delana leta 2016, sovпада z obdobjem najine ankete, pri kateri se največ veganov tako prehranjuje med 5 in 10 let.

Porast veganstva v zadnjem desetletju je omenjen tudi v različnih člankih o veganstvu, eden od njih, objavljen v časopisu Delo, omenja, da se je v letih od 2014 do 2017 v Ameriki število veganov povečalo za 600 %. Navedeni so tudi razlogi, zakaj je med njimi toliko več žensk kot moških, s čimer se ukvarjajo številni psihologi. Omenjeni so zgodovinski dejavniki in dejavniki povezani s pojmom »možatosti«, večjo dojemljivostjo žensk za sočutnost do živali in drugo (Pust, 2020).

### 7.1.7 ANALIZA SEDMEGA VPRAŠANJA

Kljub temu da veganska prehrana deluje bolj zdrava od prehrane vsejedca, lahko pri veganih pride do pomanjkanja hranil, kot so cink, železo in predvsem vitamin B12. Na vprašanje o zavedanju te nevarnosti je med 60 odgovori 76,7 % anketirancev odgovorilo pritrdilno, torej so seznanjeni z možnostjo pomanjkanja nekaterih hranil v veganski prehrani. A kar 23,3 % sodelujočih je izbralo možnost »To ne drži, saj je veganska prehrana veliko bolj zdrava od običajne in je z njo možno pridobiti vsa potrebna hranila«. Nihče ni izbral odgovora »Ne«.



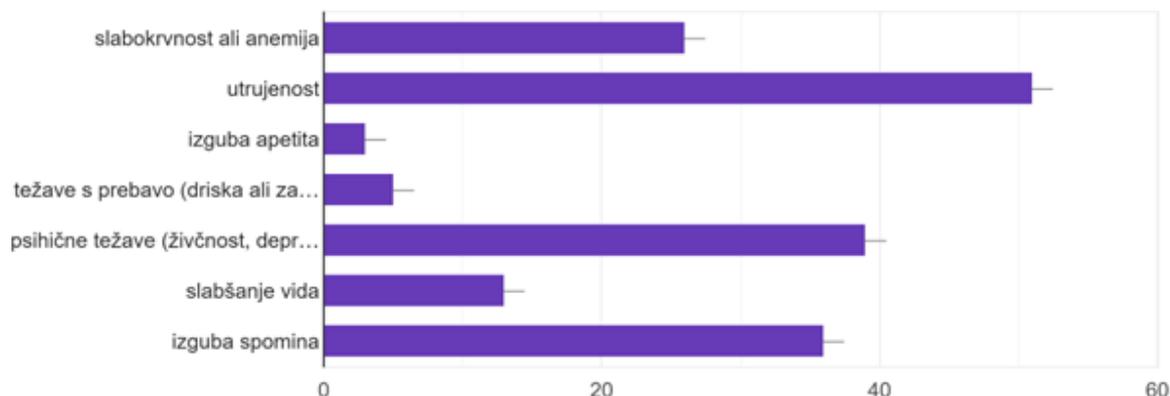
Grafikon 4: Prikaz zavedanja možnosti pomanjkanja hranil med anketirano populacijo

### 7.1.8 ANALIZA OSMEGA VPRAŠANJA

Ker sva sklepali, da je zaradi množice dostopnih virov o zdravi veganski prehrani precej več veganov, ki se zavedajo možnosti pomanjkanja določenih hranil, če se prehranjujejo povsem vegansko, naju je zanimalo, kje so dobili podatke o tem. Kot najbolj pogost vir informacij so anketiranci označili strokovno literaturo (43,3 %), sledili so spletni viri, namenjeni veganom (26,7 %), družbena omrežja (8,3 %) ter informacije sorodnikov, prijateljev oziroma znancev (5 %). Kar 10 % anketirancev pa je izbralo odgovor: »Veganska prehrana ne povzroča nikakršnih pomanjkanj hranil«, kar deloma sovпада z odgovori na sedmo vprašanje, kjer 23 % anketirancev meni, da je z vegansko prehrano mogoče pridobiti vsa potrebna hranila.

### 7.1.9 ANALIZA DEVETEGA VPRAŠANJA

Eno pomembnejših hranil, ki jih v veganski prehrani lahko primanjkuje, je vitamin B12, ki ga najdemo izključno v živilih živalskega izvora. Zanimalo naju je, katere težave, po mnenju anketirancev, povzroča njegov primanjkljaj. Rezultati so bili sledeči:



Grafikon 5: Grafikon težav, povezanih s primanjkljajem vitamina B12

### 7.1.10 ANALIZA DESETEGA VPRAŠANJA

Zavedanje tveganja primanjkljaja vitamina B12 še ni dovolj za zdrav življenjski slog, zato naju je zanimalo, kako anketiranci potrebno količino vitamina B12, ki jo vsejedci pridobijo z uživanjem mesnih izdelkov, zadovoljijo ob svoji prehrani. Pridobili sva naslednje rezultate:

- 71,7 % jih uživa prehranska dopolnila z vitaminom B12,
- 5 % jih uživa živila, obogatena z B12,
- 5 % jih v svojo prehrano vključuje živila, bogata z vitaminom B12 (alge, gobe ...),
- 3,3 % jih svojo prehrano skrbno načrtuje in pazijo, da zaužijejo dovolj rastlinskih živil z vitaminom B12,
- 5 % jih je prepričanih, da ga v njihovi prehrani ne primanjkuje,
- 3,3 % jih ni pozornih na to problematiko.

Anketiranci so pod rubriko »drugo« podali tudi odgovore:

- hranim se z ekološko pridelanimi rastlinami, pri katerih se B12 nahaja v prsti,
- uživam prehranska dopolnila, z vitaminom B12 obogatena živila.

Kar precej veganov za nadomeščanje vitamina B12 v veganski prehrani uživa prehranska dopolnila (skoraj 72 %), še 5 % jih posega po živilih, obogatenih z vitaminom B12. Celoten delež obojih povsem sovпада z odstotkom tistih, ki se zavedajo, da v njihovi prehrani tega vitamina primanjkuje, kar sva preverjali s sedmim vprašanjem. Tam je 77 % anketirancev na to vprašanje odgovorilo pritrdilno.

Zavedanje glede pomanjkanja vitamina B12 v prehrani je med vegani kar veliko, a vseeno skoraj četrtina meni, da je njihova veganska prehrana zdrava, da jim ničesar ne primanjkuje ali se s tem vprašanjem sploh ne ukvarjajo. Nekaj med njimi je zmotno prepričanih, da lahko z uživanjem domače, ekološke hrane ustrezno nadomestijo manjkajoči vitamin.

#### 7.1.11 ANALIZA ENAJSTEGA VPRAŠANJA

Poleg prehranskih dopolnil so zadnje čase vedno bolj priljubljena z vitamini obogatena živila.

Mnogi vegani, ki se zavedajo primanjkljaja vitamina B12, ga nadomeščajo z veganskimi živila, obogatenimi z B12, kot taka so navedli: kvasne kosmiče, veganska mleka, koruzne kosmiče, zeleno zelenjavo, sojino mleko, obogateno z B12, gobe šitake, alge (klorela, nori in spirulina itd). Takšna živila uživa 33,3 % anketirancev.

Tisti, ki so navedli, da vitamin B12 nadomeščajo z uživanjem gob ali alg, očitno še niso seznanjeni z dejstvom, da to niso živila, obogatena z vitaminom B12, pač pa živila, ki vitamin B12 vsebujejo, a je ta v obliki, ki je telo sesalcev ne absorbira, gre za t. i. psevdovitamin B12. (Watanabe, 2002)

#### 7.1.12 ANALIZA DVANAJSTEGA VPRAŠANJA

Večinoma vegani za nadomeščanje B12 raje posegajo po prehranskih dopolnilih. Med 81,7 % anketiranci, ki uživajo prehranska dopolnila, jih je največ navajalo naslednja: Viridian, Vivo life B12, Vagetology, Better You BOOST B12, Jamieson in Jarrow.

#### 7.1.13 ANALIZA TRINAJSTEGA VPRAŠANJA

Preverili sva, kje anketiranci kupujejo prehranska dopolnila. Na ta odgovor je odgovorilo 52 anketirancev, ki prehranska dopolnila najpogosteje kupujejo v lekarnah ali specializiranih trgovinah in v spletni prodaji, veliko manj v običajnih trgovinah.



Grafikon 6: Kraj nakupa prehranskih dopolnil

Ob iskanju v 12. vprašanju navedenih prehranskih dopolnil sva ugotovili, da so v trgovini Sanolabor (specializirana trgovina) na voljo le prehranska dopolnila Now, Jamieson, B12 Holistic in Terranova, v lekarni pa so bili na voljo le Boost, Vegan Health in Valens. To pomeni, da morebiti tudi tisti anketiranci, ki tega niso navedli, kupujejo prehranska dopolnila preko spletne prodaje.

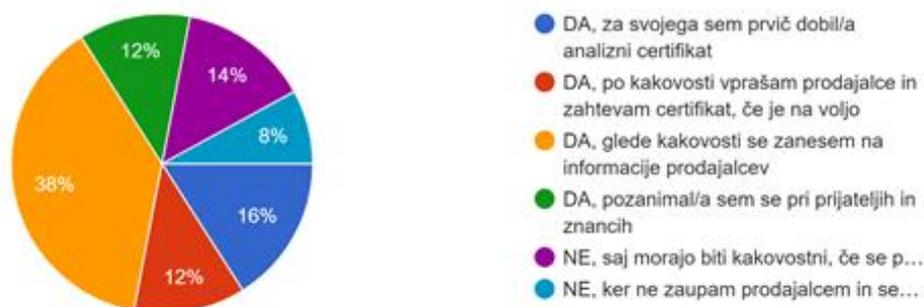
#### 7.1.14 ANALIZA ŠTIRINAJSTEGA VPRAŠANJA

Zanimivo je bilo izvedeti, ali anketiranci vedno posegajo po enakih prehranskih dopolnilih.

Kar 50 % jih vedno kupuje enaka prehranska dopolnila, 42,3 % pa prednost pred znamko daje kakovosti. Med odgovori se je pojavil tudi »Pogosto menjam znamke, če katera 'ne deluje', saj dopolnila niso regulirana«.

#### 7.1.15 ANALIZA PETNAJSTEGA VPRAŠANJA

Zanimalo naju je še zavedanje o kakovosti prehranskega dopolnila, po katerem posegajo uporabniki. Na to vprašanje je odgovorilo 50 anketirancev. Odgovori so bili precej raznoliko razporejeni, a največ se jih glede kakovosti zanese na informacije prodajalcev (38 %).



Grafikon 7: Kakovost prehranskih dopolnil B12

#### Zaključni komentar:

Po veganski prehrani najpogosteje posegajo ženske v starostni skupini od 19 do 30 let, za veganstvo se najpogosteje odločajo zaradi moralno-etičnih razlogov. Kljub navidezni »zdravosti« se večina veganov zaveda nekaterih primanjkljajev takšne prehrane, zato posegajo po živilih in prehranskih dopolnilih, ki bi ta primanjkljaj izničili. Večina še kupuje prehranska dopolnila (npr. Viridian, Vivo life B12 ipd.) v lekarnah in specializiranih trgovinah in jih izbirajo glede na informacije, pridobljene od prodajalcev.

## 7.2 HPLC DOLOČANJE VITAMINA B12

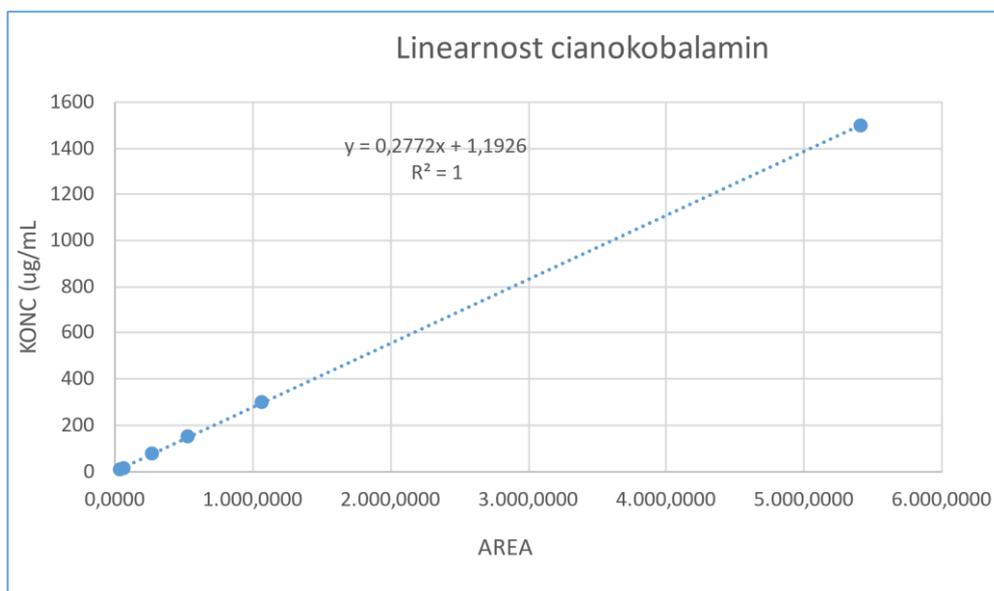
### 7.2.1 LINEARNOST CIANOKOBALAMINA

Za preverjanje linearnosti metode sva uporabili standarde, navedene v poglavju 6.2.3.1. Raztopine sva pripravili, kot je opisano v poglavju o pripravi raztopin 6.6.1.1.

Vsako od raztopin (od LIN0 do LIN5) sva injicirali dvakrat, površina (area) je povprečje obeh injiciranj.

Tabela 5: Rezultati linearnosti cianokobalamina

AREA	KONC. (µg/ml)	Oznaka raztopine
34,1424	7,5	LIN5
62,2773	15	LIN4
268,0733	75	LIN3
525,5967	150	LIN2
1.059,3050	300	LIN1
5.412,1748	1500	LIN0



Slika 14: Premica linearnosti cianokobalamina

Metoda za določanje cianokobalamina je linearna v območju koncentracij od 7,5 do 1500 µg/ml.

**KOMENTAR:** Cianokobalamin je sintetični analog vitamina B12, ki je zaradi svoje stabilnosti in cenovne ugodnosti najpogosteje uporabljen v prehranskih dopolnilih in obogateni hrani. (ivboost.uk, 2022) To je bil tudi razlog, da sva raziskavo začeli z nabavo tega standarda (še pred raziskavo trga s prehranskimi dopolnili), iskanjem ustrezne metode za analizo in preizkušanjem linearnosti.

Po analizi anketnega vprašalnika in raziskavi trga s prehranskimi dopolnili sva ugotovili, da večina trenutnih prehranskih dopolnil kot učinkovino vsebuje metilkobalamin, naravni analog vitamina B12, zato sva svoje raziskovanje nadaljevali z nakupom, iskanjem metode za analizo in preizkušanjem linearnosti tega analoga vitamina B12.

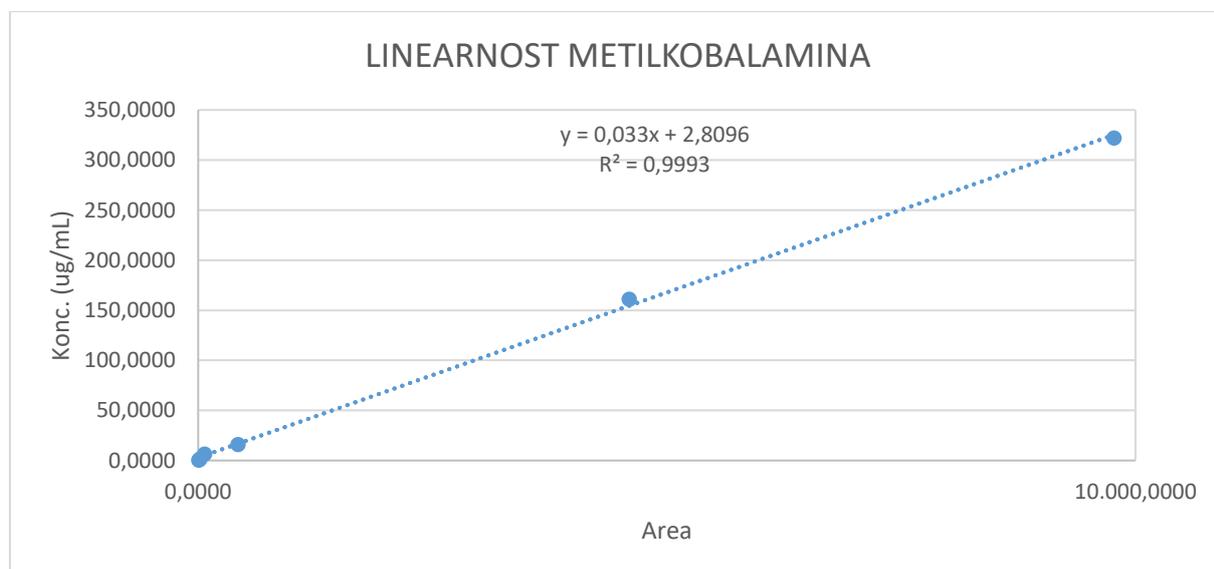
### 7.2.2 LINEARNOST METILKOBALAMINA

Za preverjanje linearnosti metode za metilkobalamin sva uporabili standarde, navedene v poglavju 6.2.3.2. Raztopine sva pripravili, kot je opisano v poglavju o pripravi raztopin 6.6.1.2.

Vsako od raztopin (od LIN0 do LIN5) sva injicirali dvakrat, površina (area) je povprečje obeh injiciranj.

Tabela 6: Rezultati linearnosti metilkobalamina

AREA	KONC. (ug/mL)	Oznaka raztop.
34,1424	0,4025	LIN5
62,2773	1,610	LIN4
268,0733	6,440	LIN3
525,5967	16,10	LIN2
1.059,3050	161,0	LIN1
5.412,1748	322,0	LIN0



Slika 15: Linearnost metilkobalamina

Metoda za določanje metilkobalamina je linearna v območju koncentracij od 0,4025 µg/ml do 322 µg/ml.

**KOMENTAR:** Metoda za metilkobalamin, ki sva jo izbrali, je bila v navedenem članku opisana z vsemi parametri validacije po ICH standardih. To so standardi, ki jih v svojih dokumentih predpisuje EMA (Evropska agencija za zdravila). (European Medical Agency,

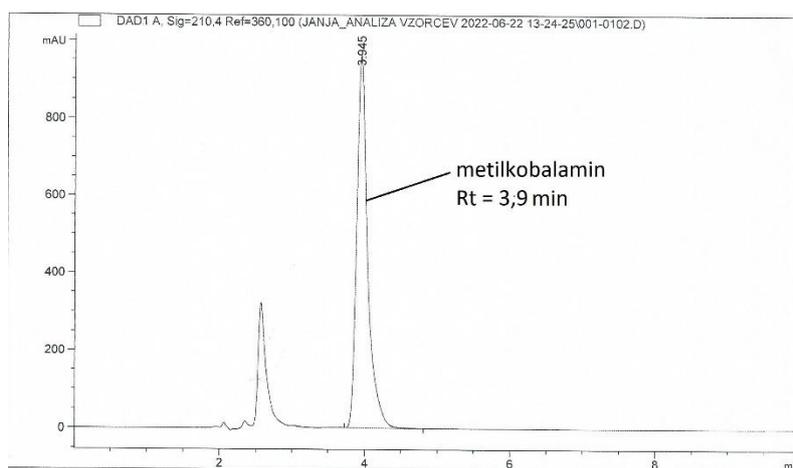
1995). Ker sva sami uporabili drugo kolono in je tudi naš HPLC sistem malenkost drugačen od opisanega v članku, predvsem pa starejši in nevalidiran po standardih kakovosti, sva še sami najprej preverili linearnost metode. Ta je v širokem koncentracijskem območju linearna, zato premico linearne regresije lahko uporabiva za izračun količine učinkovine metilkobalamina v vzorcih vseh petih prehranskih dopolnil.

### 7.2.3 PONOVLJIVOST INJICIRANJA

Koncentracijo standarda sva injicirali šestkrat, izračunali povprečno vrednost površine (area), standardno deviacijo in relativni standardni odmik (RSD).

Št. injiciranja	Area
1	9871,6
2	9845,8
3	9890,3
4	9847,5
5	9858,8
6	10025,5
povprečje	<b>9889,9</b>
STDEV	<b>68,5</b>
RSD (%)	<b>0,69</b>

**KOMENTAR:** Ponovljivost injiciranja standarda je zelo dobra (RSD manj kot 1 %), kar pomeni, da je kromatografski sistem dovolj stabilen, da daje ponovljive rezultate.



Slika 16: "peak" metilkobalamina pri analizi standarda

#### 7.2.4 PONOVLJIVOST METODE

Ponovljivost metode sva preverili z analizo dvakrat treh paralelk vzorcev tablet 1.

Koncentracijo v  $\mu\text{g/mL}$  sva za vse vzorce izračunali iz enačbe premice pri linearnosti:

$$Y = 0,033X + 2,8096,$$

pri čemer je **X** ustrežna površina (**area**) in **Y koncentracija** ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Maso metilkobalamina v  $\mu\text{g/tbl}$  sva izračunali tako, da sva koncentracijo učinkovine v  $\mu\text{g/mL}$  pomnožili s prostornino vzorca, pripravljenega v merilni bučki (100 mL), delili z maso natehtanega vzorca tablet (mg) in pomnožili s povprečno maso tablete (p. m. tbl.). Vsi podatki so navedeni v poglavju priprave vzorcev prehranskih dopolnil (6.7).

*Tabela 7: Rezultati ponovljivosti prvih treh paralelk vzorca tablet 1*

	VZ1	VZ2	VZ3
Area_povprečje (X)	753,12378	762,377865	743,06592
Konc. (Y, $\mu\text{g/ml}$ )	27,66	27,97	27,33
<b>m metilkobalamina (<math>\mu\text{g/tbl}</math>)</b>	<b>2673</b>	<b>2873</b>	<b>2662</b>
<b>povprečna m (<math>\mu\text{g/tbl}</math>)</b>	2698		
<b>STDEV</b>	52,0		
<b>RSD (%)</b>	1,9		

*Tabela 8: Rezultati ponovljivosti drugih treh paralelk vzorca tablet 1*

	VZ4	VZ5	VZ6
Area_povprečje (X)	709,92151	753,8049	769,308015
Konc. (Y, $\mu\text{g/ml}$ )	26,24	27,69	28,20
<b>m metilkobalamina (<math>\mu\text{g/tbl}</math>)</b>	<b>2683</b>	<b>2704</b>	<b>2701</b>
<b>povprečna m (<math>\mu\text{g/tbl}</math>)</b>	<b>2696</b>		
<b>STDEV</b>	12		
<b>RSD (%)</b>	0,43		

Izračunali sva še skupno povprečno maso, standardno deviacijo (STDEV) in relativni standardni odklon (RSD) za vseh šest vzorcev.

*Tabela 9: Povprečje vseh šestih paralelk vzorca*

<b>povprečna m (<math>\mu\text{g/tbl}</math>)</b>	2697
<b>STDEV</b>	34
<b>RSD (%)</b>	1,2

RSD ponovljivosti analize dvakrat treh paralelk vzorca tablet 1 je 1,2 %, kar pomeni, da metoda daje ponovljive rezultate.

**KOMENTAR:** Metoda za metilkobalamin se je izkazala za linearno in dobro ponovljivo. Začudila naju je predvsem tako velikanska razlika med povprečno vsebnostjo učinkovine metilkobalamina v naših vzorcih tablet 1 (2697 µg/tbl) in deklarirano vsebnostjo, navedeno na embalaži (1000 µg/tbl). Povprečno odstopanje je kar neverjetnih 170 %.

Iz tega razloga sva se, čeprav je metoda v literaturi validirana, odločili preveriti tudi njeno točnost. To sva izvedli na način, da sva v raztopine vzorca tablet dodali določeno znano količino raztopine standarda. Iz kromatogramov vzorcev z dodanim standardom sva izračunali koncentracijo učinkovine metilkobalamin ter od nje odšteli povprečno koncentracijo v samih vzorcih. Tako sva dobili dobljene koncentracije in s primerjavo z dodanimi koncentracijami metilkobalamina izračunali izkoristek oziroma točnost metode.

### 7.2.5 TOČNOST METODE

Točnost metode sva določili na podlagi treh paralelk vzorcev, katerim sva dodali tri različne koncentracije standarda, najnižja koncentracija je bila primerljiva s koncentracijo v vzorcu.

*Tabela 10: Rezultati analize samih vzorcev in izračun koncentracije metilkobalamina v njih*

	VZ1	VZ2	VZ3	<b>POVPREČNA KONCENTRACIJA V SAMIH VZORCIH (µg/mL)</b>
Area_povprečje (X)	908,4178	924,816	992,753	<b>941,996</b>
Konc. (Y), µg/ml)	32,79	33,33	35,57	33,90

*Tabela 11: Izračun izkoristka med dobljenimi in dodanimi koncentracijami standarda – točnosti metode*

<b>Točnost metode</b>	VZ4	VZ5	VZ6
STD – dodan (µg/ml)	25,76	64,4	128,8
Area_povprečje (X)	1810,781	3157,17	5326,98
Konc. – dobljena (Y), µg/ml	62,57	107,00	178,60
STD – dobljen (ug/ml)	28,67	73,10	144,70
<b>IZKORISTEK (%)</b>	<b>111,3</b>	<b>113,5</b>	<b>112,3</b>
<b>Povprečni izkoristek</b>	<b>112</b>		
<b>STDEV</b>	<b>1,1</b>		
<b>RSD (%)</b>	<b>0,99</b>		

Točnost metode je od 111,3 % do 113,5 % pri treh različnih koncentracijah standardov, povprečje je 112 %, sipanje (RSD) je 0,99 %.

**KOMENTAR:** Metoda je dovolj točna, da bi z njo lahko določili dejanske količine učinkovine metilkobalamina v prehranskih dopolnilih.

## 7.2.1 ANALIZA PREHRANSKIH DOPOLNIL

Analizirali sva dva vzorca v obliki tablet in tri vzorce v obliki podjezičnih pršil.

Tabela 12: Deklarirane vsebnosti analiziranih prehranskih dopolnil

	DEKLARIRANA VSEBNOST	PDV* (%)
TABLETA 1	1000 µg/tbl	40000 %
TABLETA 2	250 µg/tbl	10000 %
PRŠILO 1	250 µg/razpršek	1000 %
PRŠILO 2	6 µg/razpršek	240 %
PRŠILO 3	300 µg/razpršek	12000 %

\*PDV – delež priporočenega dnevnega vnosa za odrasle, ki je preračunan na podatek 2,5 µg po še vedno veljavni uredbi EU iz leta 2011 (Priloga XIII) (Uradni list Evropske unije, 2011)

### 7.2.1.1 ANALIZA TABLET

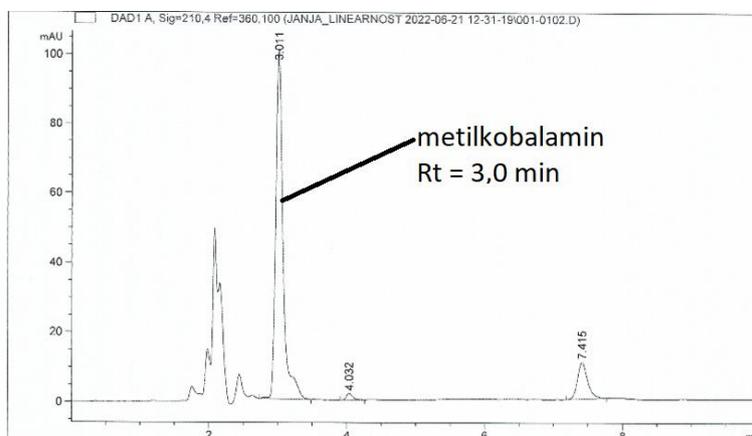
Rezultat je tabletah 1 je povprečje prvih treh paralelk vzorcev, ki sva jih uporabili za ponovljivost metode, pri tabletah 2 sva zaradi slabih kromatogramov uporabili le eno paralelko vzorca, a tudi ta ni bila najboljša

Tabela 13: Rezultati analize tablet

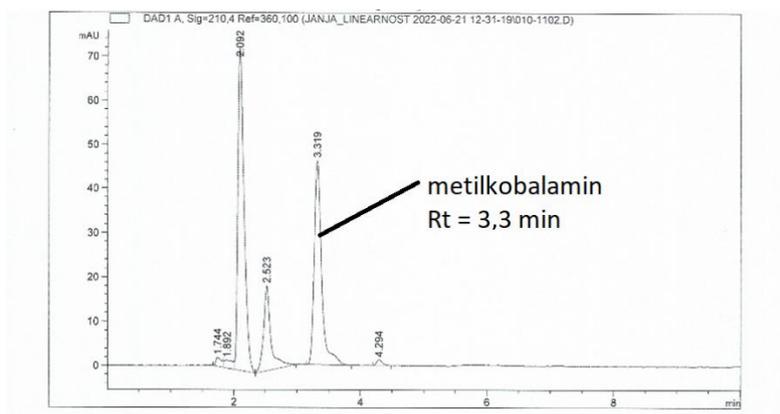
	TABLETA 1	TABLETA 2
m (metilkobalamin/tbl, µg)	2698	312
odstopanje od deklarirane vsebnosti	170 %	25 %

**KOMENTAR:** Zaradi velikega odstopanja od deklarirane vsebnosti tablete 1 in slabih kromatogramov dveh paralelk tablete 2 sva analizi obeh vzorcev ponovili še enkrat.

Dodatni razlog za ponovitev analiz je bila tudi delovanje HPLC sistema, saj sva med sekvenčno analizo vzorcev ugotovili, da prihaja do spreminjanja tlaka, kar je lahko posledica zamašitve HPLC črpalke.



Slika 17: Prvotni kromatogram analize vzorca tablete 1



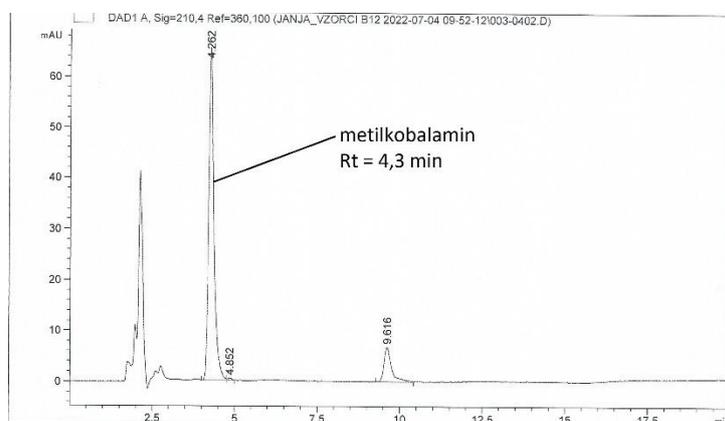
Slika 18: Prvotni kromatogram analize vzorca tablete 2

Po opravljenem servisu HPLC sistema sva tako še enkrat analizirali oba vzorca tablet. Rezultati ponovljene analize so povprečje treh paralelk obeh vzorcev tablet s podano standardno deviacijo (RSD) med paralelkami in povprečnim odstopanjem od deklarirane vsebnosti. Vsaka paralelka je injicirana dvakrat.

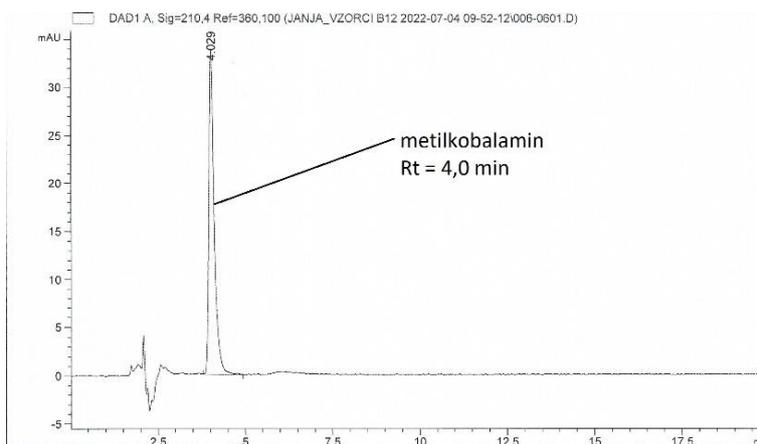
Tabela 14: Rezultati ponovne analize tablet

	TABLETA 1	TABLETA 2
m(metilkobalamin/tbl, µg)	2618	408
RSD (%)	3,1	5,1
Odstopanje od deklarirane vrednosti	162 %	63 %

**KOMENTAR:** Rezultati obeh tablet odstopajo od deklarirane vsebnosti, tablete 1 znatno bolj od tablet 2. Tudi z upoštevanjem rezultatov za točnost metode (povprečno 12 %), je odstopanje zelo veliko.



Slika 19: Kromatogram vzorca tablete 1



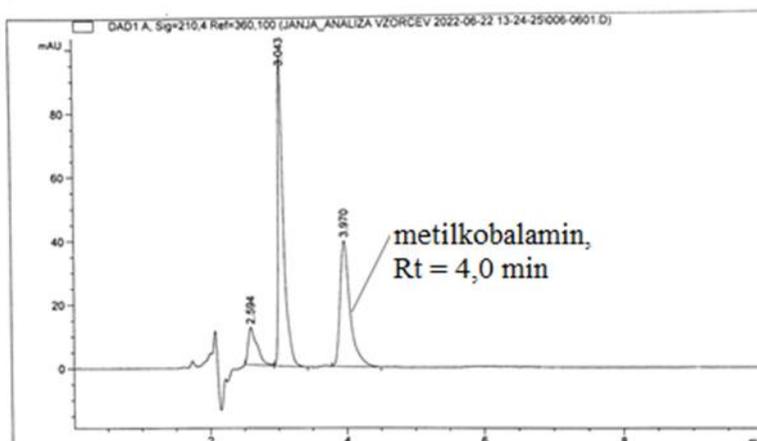
Slika 20: Kromatogram vzorca tablet 2

### 7.2.1.2 ANALIZA PRŠIL

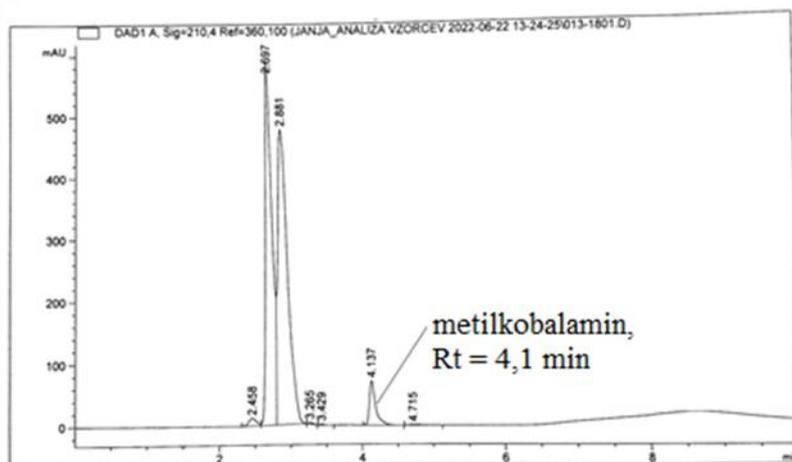
Vsak vzorec pršil sva pripravili z uporabo 4 razprškov. Rezultati so pri vseh treh pršilih povprečje treh paralelk vzorcev.

Tabela 15: Rezultati analize pršil

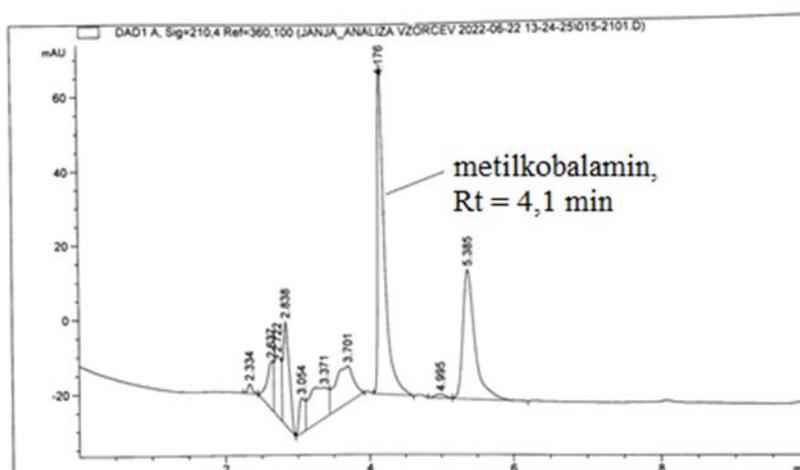
	PRŠILO 1	PRŠILO 2	PRŠILO 3
m (metilkobalamin, $\mu\text{g}/\text{razpršek}$ )	283	493	371
RSD (%)	9,8	9,2	10,0
odstopanje od deklarirane vsebnosti (%)	13	8112	24



Slika 21: Prvotni kromatogram vzorca pršila 1



Slika 22: Prvotni kromatogram vzorca pršila 2



Slika 23: Prvotni kromatogram vzorca pršila 3

**KOMENTAR:** Kljub temu da rezultati za pršilo 1 in pršilo 3 ne odstopajo od deklarirane vrednosti, so se med analizo časi odziva metilkobalamina spreminjali zaradi že zgoraj opisanih težav s HPLC sistemom (črpalko). Ker so tudi ponovljivosti slabe (visok RSD), sva vse tri vzorce pršil po servisu še enkrat analizirali.

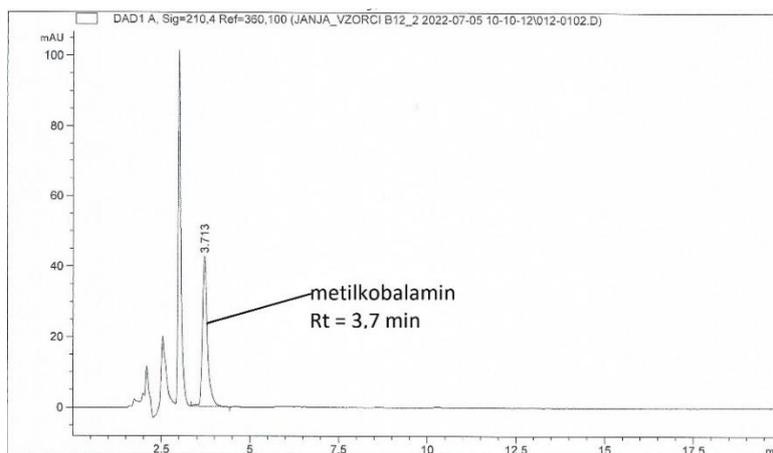
Tabela 16: Ponovljeni rezultati analize pršil

	PRŠILO 1	PRŠILO 2	PRŠILO 3
m(metilkobalamin, µg /razpršek)	416	78	306
odstopanje od deklarirane vsebnosti (%)	66	1179	2

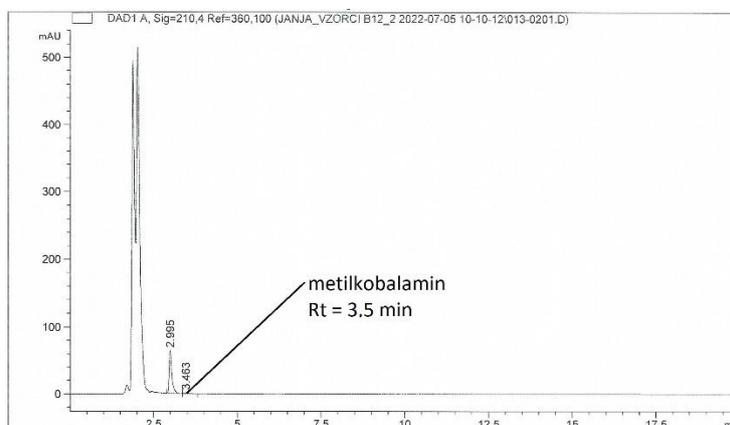
**KOMENTAR:** Ponovljena analiza je pokazala, da je najbližje deklarirani vsebnosti pršilo 3 (skoraj identično), precej več odstopa pršilo 1, medtem, ko je ima pršilo 2 zares veliko odstopanje.

Ker je na kromatogramu pršila 2 zaradi zelo majhnega odziva bilo nemogoče ugotoviti, kateri pripada metilkobalaminu, sva posneli še en kromatogram istega vzorca, tokrat z malce dodanega standarda. Po povečanju odziva sva potem ugotovili, kateri pripada metilkobalaminu. Pri tem sva ugotovili, da sva pri prvotni analizi pri tem pršilu naredili napako in za površino uporabili odziv nečesa drugega in ne metilkobalamina.

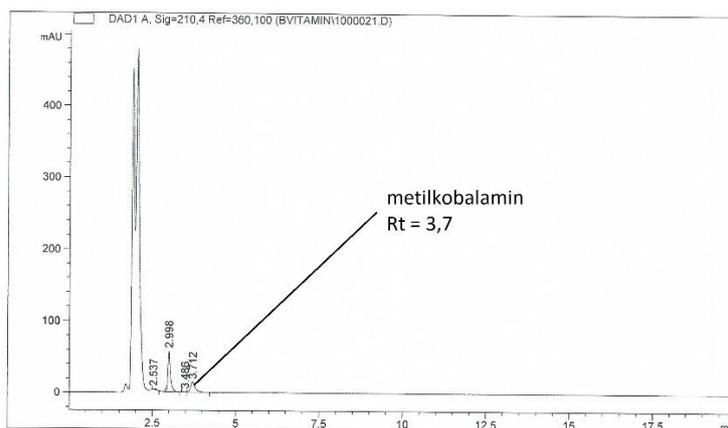
Ponovljena analiza je potekala zelo dobro, kromatografski sistem je bil ves čas stabilen, enako kot bazna linija, odzivi so bili dovolj zaznani in simetrični, zato meniva, da so ti rezultati ustrezni po metodi, ki sva jo uporabili.



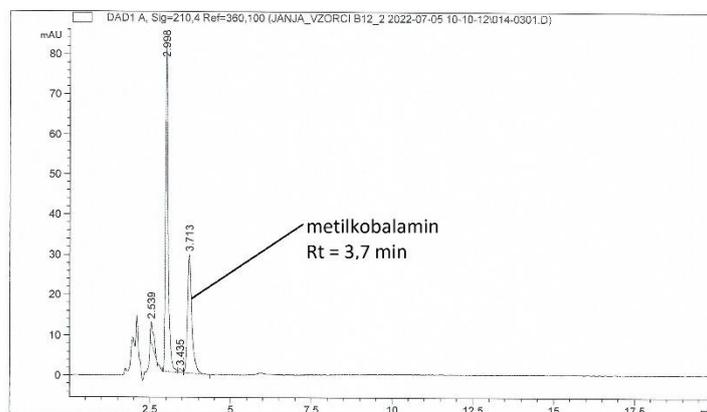
Slika 24: Kromatogram vzorca pršila 1



Slika 25: Kromatogram vzorca pršila 2



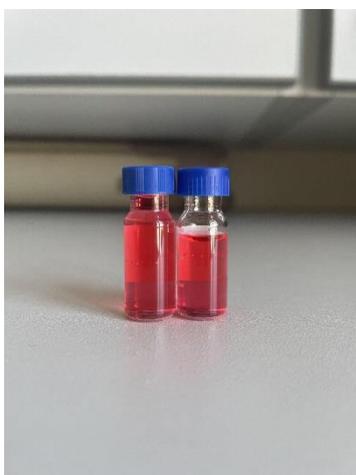
Slika 26: Kromatogram vzorca pršila 2 z dodanim standardom za identifikacijo odziva metilkobalamina



Slika 27: Kromatogram pršila 3

### 7.2.2 STABILNOST STANDARDA

Raztopina standarda je bila izpostavljena različnim pogojem, in sicer svetlobi in sobni temperaturi (spreminjajoča se), temi in nizki temperaturi (hladilnik) ter temi in regulirani temperaturi 25 stopinj Celzija (sušilnik).



Slika 28: Viale s standardom, izpostavljene svetlobi za 48 h

Koncentracija standarda: 322 µg/ml.

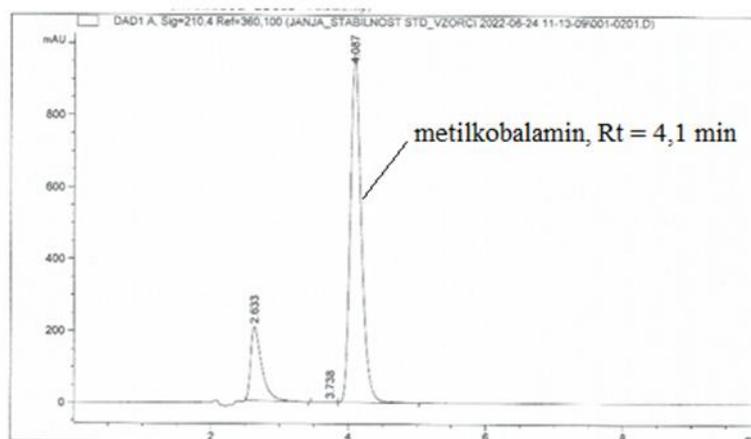
Vsaka zapisana površina je povprečje dveh injiciranj.

Tabela 17: Sprememba aree pri standardih, izpostavljenih različnim zunanjim pogojem

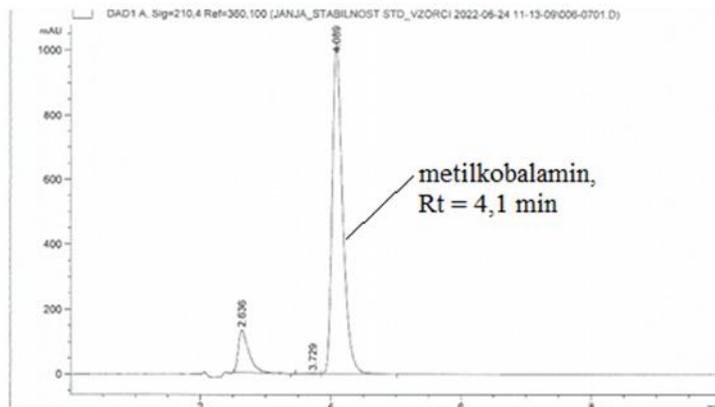
	Area povpr.	Razlika (%)
<b>Standard svež - odziv (area)</b>	10131,75	
<b>Standard 1 - 48 h, tema, hladilnik</b>	10892,25	7,51
<b>Standard 2 - 48 h, tema, hladilnik</b>	11136,45	9,92
<b>Standard 1 - 48 h, svetloba, sobna T</b>	/	ni odziva
<b>Standard 2 - 48 h, svetloba, sobna T</b>	/	ni odziva
<b>Standard 1 - 48 h, tema, sušilnik 25 °C</b>	11480,96	13,32
<b>Standard 2 - 48 h, tema, sušilnik 25 °C</b>	11294,45	11,48

**KOMENTAR:** Na svetlobi je metilkobalamin ( $R_t = 4,0$  min) popolnoma razpadel, močno se je povečal odziv pri  $R_t = 2,6$  min. Ta naj bi po navedbah iz literature pripadal bolj stabilnemu analogu vitamina B12, to je hidroksimetilkobalamin. V literaturi je navedeno, da je metilkobalamin zelo občutljiv na svetlobo, na kateri skoraj trenutno razpade. Razpadni produkt hidroksikobalamin je bil potrjen z molekulska maso. (A. H. Chamle, 2018)

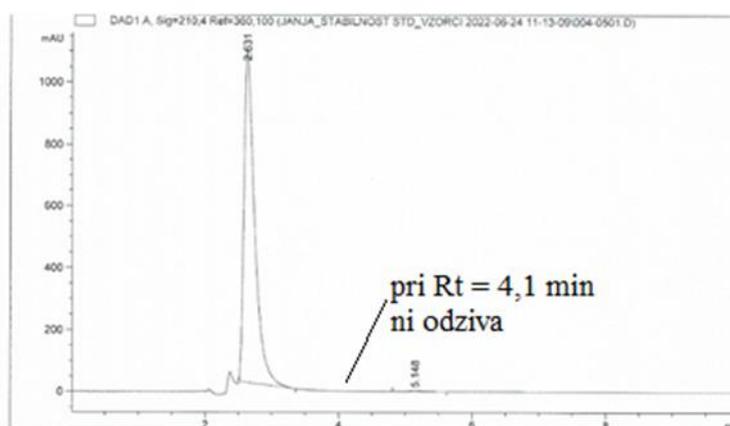
Vse razlike v povprečnih površinah odziva standarda pri stabilnosti standarda v temi so blizu 10 %, kar je v mejah dobljene točnosti naše metode.



Slika 29: Kromatogram standarda po 48 h v temi v hladilniku



Slika 30: Kromatogram standarda po 48 h v temi v sušilniku na 25 °C



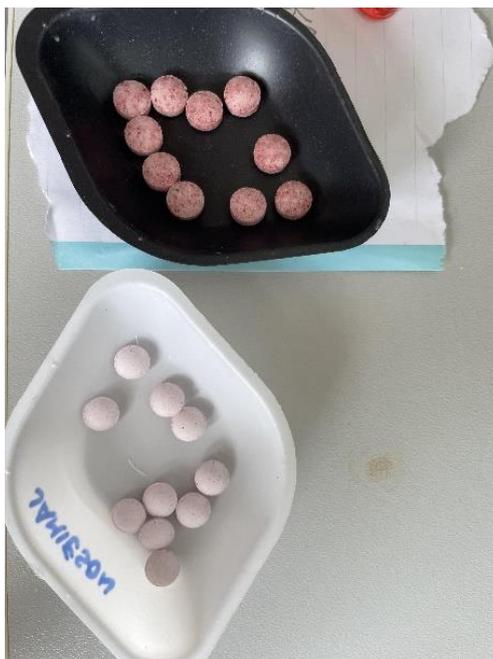
Slika 31: Kromatogram standarda po 48 h na svetlobi pri sobni temperaturi

### 7.2.3 STABILNOST VZORCEV PREHRANSKIH DOPOLNIL

Prehranska dopolnila v obliki tablet sva izpostavili različnim pogojem, in sicer sva cele in zdrobljene tablete postavili na svetlobo in sobno temperaturo.

#### 7.2.3.1 CELE TABLETE NA SVETLOBI

Ko sva ugotovili, kako zelo je nestabilna učinkovina metilkobalamin na svetlobi, ne pa veliko na temperaturo, sva cele tablete vzorca tablet 1 in tablet 2 pustili na svetlobi (nepokrite in nezaščitene) 48 ur (2 dni). Po tem času sva pripravili raztopini vzorca in ju analizirali enako kot sveže. Primerjali sva rezultate vsebnosti metilkobalamina med vzorci tablet iz originalne embalaže ( $t = 0$  h) ter vzorci tablet, ki so dva dni stale na svetlobi ( $t = 48$  h).

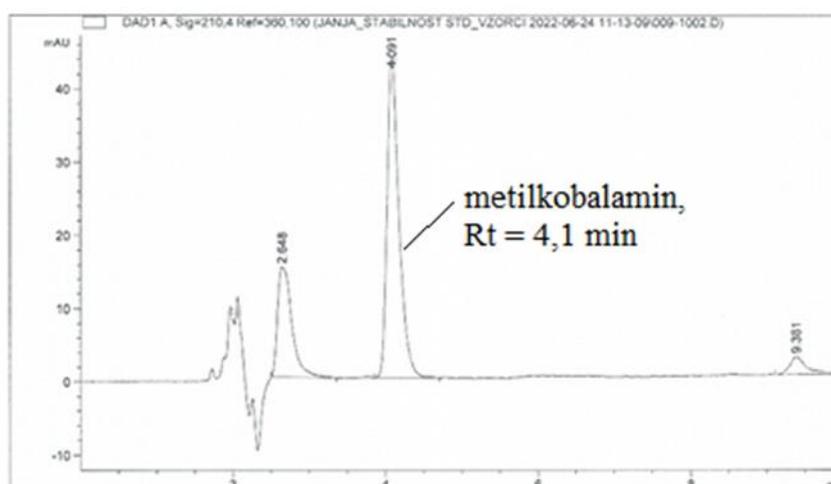


Slika 32: Cele tablete 1 po 48 urah na svetlobi (zgoraj) v primerjavi z originalnimi (spodaj)

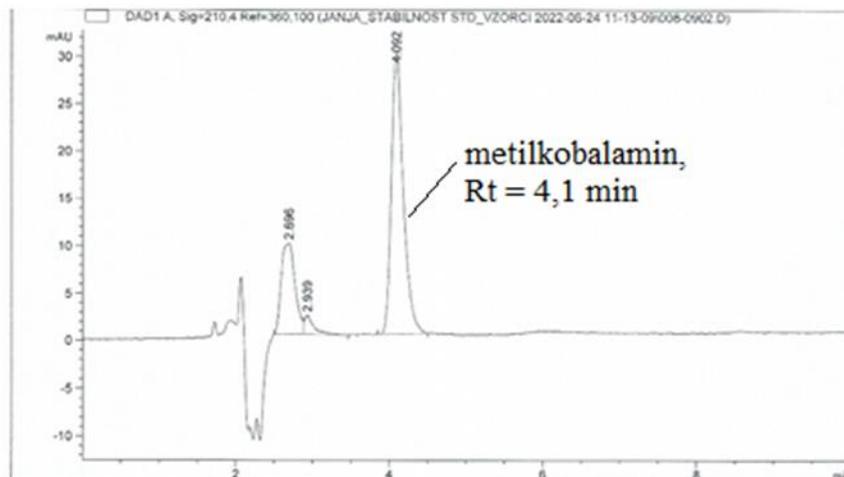
Rezultati so povprečje dveh injiciranj vsakega od vzorcev tablet.

Tabela 18: Rezultati analize celih tablet prehranskih dopolnil, hranjenih 48 h na svetlobi

Izračun metilkobalamina	TABLETE 1	TABLETE 2
<b>m (metilkobalamin/tbl, <math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>2065</b>	<b>338</b>
<b>m(metilkobalamin/tbl, <math>\mu\text{g}</math>), t = 0 h</b>	<b>2698</b>	<b>312</b>
<b>stabilnost (%)</b>	<b>-23</b>	<b>8</b>



Slika 33: Kromatogram vzorca celih tablet, izpostavljenih svetlobi 48 h



Slika 34: Kromatogram vzorca celih tablet 2, izpostavljenih svetlobi 48 h

**KOMENTAR:** Iz rezultatov je razvidno, da je količina metilkobalamina v tabletah 2, ki so stale na svetlobi, primerljiva s količino v tabletah, vzetih iz originalne embalaže. Vzorec tablet 2 je stabilen na svetlobi, saj je razlika (8 %) v okviru ugotovljene točnosti metode. Količina metilkobalamina v tabletah 1, ki so stale 48 h na svetlobi pa se je v primerjavi s sveže uporabljenimi tabletami (0 h) zmanjšala za četrtno (23 %), kar je več kot je ugotovljena točnost metode. Sklepamo lahko, da so tablete 1 na svetlobo bolj občutljive, kar bi lahko deloma sklepali že iz precej spremenjenega videza tablet (Slika 26).

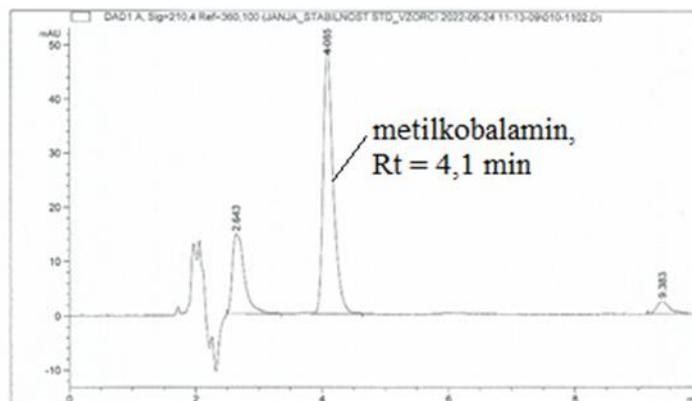
### 7.2.3.2 ZDROBLJENE TABLETE NA SVETLOBI

Preverili sva še stabilnost zdrobljenih tablet 1, ki sva jih pustili na svetlobi 48 ur (2 dni) ter iz njih pripravili raztopino vzorca in jo analizirali. Primerjali sva rezultat vsebnosti metilkobalamina med vzorcem tablet iz originalne embalaže ( $t = 0$  h) ter vzorcem tablet, ki so dva dni stale zdrobljene na svetlobi ( $t = 48$  h).

Tabela 19: Rezultati analize zdrobljenih prehranskih dopolnil, izpostavljenih svetlobi

Izračun metilkobalamina	TABLETE 1
m (metilkobalamin/tbl, $\mu\text{g}$ )	2318,63
m(metilkobalamin/tbl, $\mu\text{g}$ ), t = 0 h	2698
stabilnost (%)	-17

**KOMENTAR:** Količina metilkobalamina v tabletah 1, ki so zdrobljene stale 48 h na svetlobi se je v primerjavi s sveže uporabljenimi tabletami (0 h) zmanjšala za 17 %, kar je več kot je ugotovljena točnost metode.



Slika 35: Kromatogram PD 1, izpostavljenega svetlobi za 48 ur v obliki zdrobljenih tablet

### 7.3 PREHRANSKA DOPOLNILA Z VITAMINOM B12 NA SLOVENSKEM TRGU

Prehranska dopolnila z vitaminom B12 so, kot vsa druga, na voljo v lekarnah in specializiranih prodajalnah. Pregled nekaterih specializiranih prodajal in lekarn na spletu ponudi številne izdelke, ki so v prodaji kot prehranska dopolnila vitamina B12 (Tabela 4), večina med njimi vsebuje učinkovino metilkobalamin.

Zanjo navajajo, da je naravna in biološko najbolj učinkovita oblika vitamina B12, čeprav je jasno, da se vse oblike pretvorijo v znotrajcelične aktivne oblike v razmerju, na katerega oblika zaužitega B12 nima vpliva. (Christiana Paul, 2022)

Da je veganstvo v porastu, je razvidno tudi iz poplave prehranskih dopolnil vitamina B12, pri katerih ponudniki navajajo, da so primerna tudi za vegane.

Tabela 20: Pregled prehranskih dopolnil na trgu

Blagovna znamka / prodajalna	Ime izdelka	Farmacevtska oblika in pakiranje	Učinkovina	Deklarirana vsebnost	Cena na spletu	Dnevni odmerek / priporočen dnevni vnos (% PDV*)
Holistic / Sanolabor	Vitamin B12	raztopina, 150 ml	cianokobalamin	500 µg/2,5 ml	18,90 €	enkrat merica 5 ml, drugič polovična merica (2,5 ml), na embalaži količina za 60 dnevni odmerkov (2,5 ml) / 20000 %.
Now / Sanolabor	Methyl B-12	žvečljive tablete, 100 tbl	metilkobalamin	1000 µg/tbl	14,65 € 16,09 €	1 tbl / 40000 %
Better you / Sanolabor, DM	Boost Vitamin B12 Daily Oral Spray	ustno pršilo, 25 ml	metilkobalamin	1200 µg/4 razprške	15,50 €	4 razprški / 48000 %
Terranova / Sanolabor	Vitamin B12 500 µg	kapsule, 50 kapsul	metilkobalamin	500 µg/kapsulo	18,24 €	1 kapsula / 20000 %
G&G Vitamins / Lekarna Ljubljana	Vitamin B12 1000 µg	kapsule, 120 kapsul	metilkobalamin	1000 µg/kapsulo	16,15 €	1 kapsula / 40000 %
Jamieson / Lekarna Ljubljana	B 12 250 µg	podjezične tablete, 100 tbl	metilkobalamin	250 µg/tbl	8,75 € 9,44 €	1 tbl / 10000 %
Jamieson / Lekarna Ljubljana	B 12 1000 µg	podjezične tablete, 100 tbl	metilkobalamin	1000 µg/tbl	14,24 €, 14,46 €	1 tbl / 40000 %
Valens / Lekarna Ljubljana	B 12	ustno pršilo, 25 ml	metilkobalamin	250 µg/razpršek (0,2 ml)	10,35 €	1 razpršek / 10000 %

Natural Wealth / Lekarna Ljubljana	B 12	tablete, 50 tbl	cianokobalamin	100 µg/tbl	12,71 €	1 tbl / 4000 %
Ekolife Natura / Lekarna Ljubljana	Liposomal vitamine B12	tekočina, 60 ml	hidroksokobalamin	2 µg/2 ml	17,01 €	2 ml / 80 % (pri sestavi napaka, saj je navedena vrednost 2 mg in 80 % PDV)
Soria Natural / DM	Vit B12	tablete s podaljšanim sproščanjem, 48 tbl	vitamin B12 (oblika ni navedena)	2,5 µg/tbl	9,45 €	1 tbl / 100 %
Nutrilab / DM	Vitamin B12	kapsule, 60 kapsul	cianokobalamin	ni podatka	5,99 €	1 kapsula
Mivolis / DM	Vitamin B12	šumeče tablete, 20 tbl	cianokobalamin	12,5 µg/tbl	0,89 €	1 kapsula / 500 %
Ulla cosmetics / DM	Vitamin B12	ustno pršilo, 10 ml	cianokobalamin	2,5 µg/2 razprška (200 mg)	6,99 €	2 razprška / 100 %

\*PDV v % je povzet po priporočilih Nacionalnega inštituta za javno zdravje (NIJZ). Po navedbah je 100 % PDV za odraslega človeka 4 µg na dan (Tabela 2). (Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2022)

Dnevni priporočeni vnosi v % na izdelkih ne sledijo slovenskim priporočilom NIJZ, pač pa so preračunani na priporočeni dnevni odmerek 2,5 µg, kar je manj od priporočil NIJZ ali EFSE. Na nekaterih izdelkih je navedeno, da ustrezajo PDV, kot ga podaja EFSA ali EU, kar pa večinoma za odraslo osebo ne ustreza. Tudi EFSA priporoča za odraslo osebo 4,0 µg. (Authority, 2015)

## 8 RAZPRAVA

Z raziskovanjem poznavanja prehrane veganov sva ugotovili, da nekatera dejstva ostajajo skrita tako nam, kot veganom samim, zato naju je zanimalo poznavanje le teh. Tu gre predvsem za pomanjkanje nekaterih hranil, med katerimi je vitamin B12 tisti, ki ga s striktno vegansko prehrano ni mogoče dobiti. Z najino anketo sva ugotovili, da se dobre tri četrtine ljudi (76,7 %), ki se prehranjuje vegansko, zaveda pomanjkanja vitamina B12 in nekaterih drugih hranil v njihovi prehrani. Na drugi strani je slaba četrtina (23,3 %) anketirancev prepričanih, da je veganska prehrana bolj zdrava od prehrane vsejedca in ne le to, prepričani so, da je z njo možno pridobiti vsa potrebna hranila.

Slabo poznavanje veganske diete si mogoče lahko razlagamo z dejstvom, da je kar 76,7 % anketirancev veganov zaradi moralno-etičnih razlogov, le 13,3 % se je za to dieto odločilo iz zdravstvenih razlogov. Poleg tega se poraja vprašanje o zavedanju ustreznosti veganske prehrane pri tistih, ki so se za tak način odločili, zaradi »modernosti« omenjene prehrane.

Mogoč razlog je tudi to, da je še vedno precej veganov, ki menijo, da lahko vitamin B12 dobimo iz živil, kot so različne gobe (šitake) ali alge (klorela, spirulina), ki so pri veganih precej pogoste v njihovi prehrani. A raziskave so pokazale, da le ta živila vsebujejo za nas neprebavljiv vitamin B12, t.i. psevdovitamin.

***Hipotezo A o tem, da se 90 % veganov zaveda pomanjkanja B12 v svoji prehrani sva tako ovrgli.***

Skoraj enako število veganov, kot se jih zaveda pomanjkanja vitamina B12, le tega nadomešča s prehranskimi dopolnili. Takih je kar 71,7 % anketirancev. Ostalih 5 % tistih, ki se zavedajo pomanjkanja tega pomembnega vitamina, ga nadomešča z živili, obogatenimi z vitaminom B12, npr.: kvasni kosmiči, sojino mleko obogateno z vitaminom B12, rastlinski napitki z dodanimi vitamini. Problem z vitaminom B12 obogateno hrano je oblika vitamina, ki se nahaja v živilu. Po navadi gre za obliko metilkobalamin, ki je zelo občutljiva na svetlobo, na kateri praktično popolnoma razpade.

Nekaj ljudi je seveda takih, ki menijo, da vitamin B12 nadomeščajo z uživanjem gob ali alg, kar smo že ugotovili, da ne drži.

Nekateri celo menijo, da če uživajo domačo in ekološko pridelano hrano, z njo dobijo vsa potrebna hranila, kar kaže tudi na popolno nepoznavanje tako ekološke pridelave kot veganstva. Zdi se, da je med ljudmi v vseh generacijah nekaj takih, ki enostavno nimajo dovolj znanja in ga niti ne znajo ali celo ne želijo pridobiti. Nekateri pa se zanesejo na »posredna« znanja, ki jih dobijo na družbenih omrežjih, ki pa, kot vemo, so velikokrat netočna in nezanesljiva.

Nekakšno smiselno alternativo predstavljajo prehranska dopolnila, kjer pa se pojavlja vedno več podrobnosti, na katere moramo biti pozorni. Ker prehranska dopolnila niso zdravila, kar mora biti na embalaži posebno označeno, ustrezno kakovostno analizno

preizkušanje za pojav na trgu ni obvezno, zato se hitro zgodi, da gre za izdelke slabše kakovosti. Sami sva za preverjanje kakovosti prehranskih dopolnil želeli pridobiti analizne certifikate, dobiti pa je bilo možno le enega in še to le na vpogled, za druge so proizvajalci dejali, da potrošnikom niso na voljo.

Že sami sva sicer podvomili, da je zelo veliko veganov tistih, ki jim je na prvem mestu pomembna kakovost prehranskih dopolnil, a mislili sva si, da jih je mogoče vsaj polovica. Iz rezultatov ankete pa je razvidno, da se kar 22 % anketirancev o kakovosti prehranskih dopolnil ne pozanima, še preostalih 12 % pa se pozanima pri prijateljih in znancih, kar pogosto ni najbolj zanesljivo zagotovilo za kakovost. Nadalje je 38,5 % anketirancev, ki se poslužuje spletne prodaje, preko katere ne moremo dobiti informacij o kakovosti prehranskih dopolnil oziroma je po opozorilih uradnih inštitucij (NIJZ) način nabave prehranskih dopolnil, ki ni najboljši, saj ne vemo, kdo stoji v ozadju te prodaje.

Zanimivo je tudi, da jih je med anketiranci kar 16 % odgovorilo, da so za svoje prehransko dopolnilo prvič dobili certifikat, a po najinih izkušnjah, ki sva jih pridobili pri trgovcih, v tako visok rezultat malce dvomiva.

***Hipotezo B, kjer sva menili, da je vsaj polovici veganom pomembna kakovost prehranskih dopolnil z vitaminom B12, lahko potrdiva, če seštejeva vse tiste, ki se o kakovosti prepričajo na kakršenkoli način ali jim je ta vsaj pomembna.***

Pri HPLC analizi sva naleteli na precej problemov in nepričakovanih situacij. Prva je bila ta, da sva iz literature brez predhodnega pregleda trga prehranskih dopolnil, sklepali, da večina vsebuje učinkovino cianokobalamin, ki je cenovno najugodnejši in ga umetno pripravljajo s tem namenom. Realnost je pokazala popolnoma drugačno sliko, večina prehranskih dopolnil vsebuje metilkobalamin. Zato sva za svoje analize nabavili najprej standard cianokobalamin, potem še metilkobalamin. Slednji je bil precej dražji in primorani sva bili v nakup manjše količine, zato ga za vse analize, tudi ponovljene po drugi metodi več nisva imeli dovolj. Metoda, ki sva jo izbrali za analizo produktov z metilkobalaminom, je bila sicer validirana, a ugotovili sva, da je valovna dolžina za detekcijo učinkovine, 210 nm, na strmem področju UV VIS spektra za metilkobalamin, kar je lahko problematično, saj majhna napaka detektorja lahko vodi v precejšnjo razliko med rezultati. (Shah & Shah, Vol 9, Issue 4, 2017). Metoda, ki sva jo izbrali in uporabili, je sicer v širokem koncentracijskem območju linearna (faktor  $R^2$  je 0,9993), tudi ponovljivost injiciranja je zelo dobra. Ravno tako je dobra ponovljivost metode, ki sva jo preizkusili na enem od petih analiziranih vzorcev s šestimi paralelkami (RSD je znašal 1,2 %). Slabša od pričakovanj in podatkov v članku pa je ugotovljena točnost metode (povprečje 112 %). Ravno zaradi točnosti bi ob zadostni količini standarda zagotovo preizkusili še kakšno od v literaturi najdenih metod, a žal to ni bilo mogoče.

***Hipotezo C, da je metoda za metilkobalamin v širokem koncentracijskem območju linearna, daje ponovljive in točne rezultate lahko delno potrdiva, saj rezultati točnosti niso najboljši.***

Ker je v literaturi že ugotovljeno, da je standard metilkobalamin zelo fotosenzibilen (A. H. CHAMLE, 2018), sva to želeli preizkusiti tudi sami. Standard se je izkazal za precej obstojnega, če ga hranimo v temi in zelo nestabilnega na svetlobi. Po dveh dneh vrha z metilkobalaminom na kromatogramu odziva metilkobalamina ni bilo več.

Pri stabilnosti vzorcev tablet, hranjenih na svetlobi, pa nisva ugotovili tako zelo drastičnih razlik. Pri analizi vzorca tablet 1 je sicer bil opažen padec vsebnosti učinkovine za blizu 20 %, a vseeno učinkovina ni razpadla v celoti, tako kot v samem standardu. Poleg tega se pri tabletah 2 ni pokazalo znatno znižanje vsebnosti učinkovine metilkobalamina.

***Hipotezo D, da se bo standard metilkobalamin, izpostavljen svetlobi, popolnoma razgradil, enako se bo zgodilo tudi v tabletah prehranskih dopolnil, če jih hranimo odprte na svetlobi, lahko delno potrdiva. Potrjujeva del, vezan na standard, na tablete pa ne v celoti.***

Z rezultati analiz prehranskih dopolnil nisva zadovoljni, saj sva za tablete 1 tudi po večkratni analizi dobili vedno podobne in ponovljive rezultate vsebnosti, ki pa so za 170 % odstopali od deklarirane vsebnosti, navedene na embalaži (namesto 1000 µg, sva midve dobivali rezultate od 2600 do 2700 µg). Tudi analiza tablet 2 je pri ponovitvi, kjer je bila kromatografija boljša (dodatno preverjen HPLC sistem po opravljenem servisu), dala precej višje rezultate kot so deklarirani.

Glede na to, da je najina metoda pokazala tako linearnost odzivov od koncentracije, ponovljivost metode in tudi relativno dobro točnost, so možni razlogi za odstopanje v tem, da se v odzivu metilkobalamina (identificiran po retenzijskem času) lahko »skriva« še katera druga substanca. To bi lahko ugotovili z analizo čistosti odziva (»peak purity«), ki pa ga midve na našem sistemu nisva mogli izvesti.

A vseeno lahko kar z veliko verjetnostjo trdimo, da je bila v tabletah 1 večja količina metilkobalamina od deklarirane vsebnosti, saj bi težko tako veliko razliko pripisali le prikrivanju odzivov.

Pri pršilih so pri pršilu 1 rezultati višji od deklarirane vsebnosti, a tudi tu bi to dejstvo lahko pripisali morebitnim drugim odzivom, ki so skriti pod odzivom metilkobalamina. Rezultati za tretje pršilo so skoraj povsem identični deklarirani vsebnosti, tudi kromatogram je lep. Tu je še drugo pršilo z izrazito nižjo deklarirano vsebnosti (6 µg) od ostalih dveh. Po tem, ko sva z dodatkom standarda v raztopino vzorca identificirali, kateri odziv pripada metilkobalaminu (v prvotni analizi nisva upoštevali pravega odziva, oziroma je bil dejanski tako majhen, da ga prvotni integracijski parametri niso zaznali, na celotni skali pa ni bil opazen), je bil rezultat sicer dosti nižji kot pri prvotni analizi, a še

vedno veliko preveč oddaljen od deklarirane vsebnosti. Tudi tu bi sicer lahko bila znotraj odziva še kaka druga substanca, a tako veliko odstopanje težko pripiševa temu.

Vsekakor se zavedava, da bi dileme o ustreznosti analize vzorcev lahko uspešno rešili, če bi analize ponovili z drugo metodo. Na spletu jih je še kar nekaj, tudi z valovnimi dolžinami, ki so boljše izbrane (na »platojih« UV spektra metilkobalamina), a na žalost zaradi povsem porabljenega standarda to ni bilo mogoče.

Kot rezultat analize vzorcev prehranskih dopolnil bi dejali, da bi trije od petih morebiti lahko ustrezali deklarirani vsebnosti, medtem ko dva (ene tablete in eno pršilo) skoraj zagotovo ne, saj so odstopanja zares velika.

***Hipotezo E, da bodo rezultati analize vsebnosti učinkovine v prehranskih dopolnilih primerljivi z deklariranimi vrednostmi, navedenimi na embalaži, lahko delno potrdiva, saj bi to lahko veljalo za tri od petih prehranskih dopolnil.***

Pri nabavi prehranskih dopolnil sva želeli preko prodajalk priti do dokumentacije proizvajalcev, ki bi zagotavljala kakovost izdelkov, a so po poizvedovanju pri proizvajalcih prodajalke (farmaceutke) tako v lekarni kot v specializirani prodajalni povedale, da dokumentacija o analizah in zagotovitvi kakovosti (analizni certifikat) ni na voljo potrošnikom. Le v lekarni je farmacevtka en certifikat pridobila, a nama je bil na voljo le na vpogled. Tako ga niti nisva mogli zares dobro preučiti.

***Hipotezo F, da bodo za prehranska dopolnila v lekarnah in specializiranih prodajalnah na voljo dokumentacije proizvajalcev, ki zagotavljajo njihovo kakovost, ne moreva potrditi, ker to ne drži.***

Glede na to, da je regulativa prehranskih dopolnil minimalna in omogoča, da so na trgu dostopna tudi prehranska dopolnila slabše kakovosti, je v primeru redne uporabe prehranskih dopolnil z vitaminom B12 smiselno poseči po zdravilih, ki vsebujejo ta vitamin, saj so veliko bolj preverjana in imajo dostopna navodila za uporabo. Nekaj zdravil iz baze podatkov zdravil: B-complex filmsko obložene tablete z 1 µg cianokobalamina v tableti, Makrovit obložene tableta z 2 µg cianokobalamina, Elevit Pronatal filmsko obložene tablete s 4 µg cianokobalamina, Pikovit forte obložene tablete s 6 µg cianokobalamina. (NIJZ, 2022)

## 9 ZAKLJUČEK

Pri ustvarjanju raziskovalne naloge sva se srečali z mnogimi izzivi. Naučili sva se poglobljenega dela z različnimi viri in iskanja ter zapisa pomembnih podatkov, prav tako pa sva se prvič srečali z analizo kemijo in HPLC kromatografijo ter pridobili mnoga znanja, ki nama bodo v nadaljnjem življenju še koristila.

Poglobljeno raziskovanje prehrane veganov je potrdilo, da uživanje samo živil rastlinskega izvora morda le ni tako zdravo, kot si nekateri radi mislijo. Utrdili sva zavedanje, da zdrava prehrana pride z uravnoveženimi obroki.

Z anketiranjem veganske populacije sva dobili vpogled v veganski aspekt prehranjevanja in pravzaprav tudi življenja. Zanimivo je bilo izvedeti, da se mnogi sploh ne zavedajo pomanjkljivosti lastne prehrane in določenih hranil ne nadomeščajo s prehranskimi dopolnili, zato tvegajo pomanjkanje in zaplete, ki pridejo z njim. Presenetilo naju je tudi, da vegani kljub nekaterim simptomom oz. obolenjem, ki jih doživljajo zaradi svoje prehrane, ne ukrepajo prav dosti. Seveda obstajajo vegani, ki so dobro podučeni o lastni prehrani in se odločajo hranila živalskega izvora nadomeščati s prehranskimi dopolnili, ki pa žal velikokrat niso preveč skrbno izbrana.

Pojavilo se je torej vprašanje prehranskih dopolnil. Že od prej veva, da regulacija trga prehranskih dopolnil ni niti približno tako stroga kot trga zdravil, vseeno pa sva pričakovali nekaj več možnosti za poizvedovanje o kakovosti prehranskih dopolnil. Glede na dejstvo, da je skoraj nemogoče pridobiti dokumentacijo za prehranska dopolnila, naju ni čudilo, ko sva s HPLC analizo ugotovili, da deklarirane vsebnosti pogosto odstopajo od realnih.

Z rezultati sva dobili realen vpogled v svet prehranskih dopolnil. Naučili sva se rokovati z mnogimi laboratorijskimi pripomočki, s katerimi se prej še nisva srečali, uporabe HPLC aparature, kako pomembna je točnost metode in njena ponovljivost.

Točnost rezultatov bi sicer lahko bila boljša, če nama ne bi kontrirali starost in obrabljenost naprave HPLC in omejena količina standarda.

Lahko bi rekli, da sva cilje dosegli polovično, saj bi za to, da bi lahko bolj konkretno potrdili najine rezultate, potrebovali več standarda in več ponovitev postopka, a navkljub temu sva prišli do smiselnih rezultatov, s pomočjo katerih sva ovrednotili svoje hipoteze.

Na koncu pa je najbolj pomembno, da se pri izbiri diete in pripravkov, ki jih vnašamo v svoje telo dobro pozanimamo o njenih učinkih na naše telo. »Ni vse kar se sveti zlato.« Telo je le eno in pomembno je prisluhniti njegovim potrebam in jih čim bolj ugoditi in to ne drži le za vegane.

Ker ima najina naloga uporabno vrednost, sva se odločili izvlečke najin角度 odkritij deliti tudi z vegani, in sicer preko socialnega omrežja Facebook v skupini *Vegani, vegetarijanci, presnojedci*.

## 10 VIRI

- A. H. Chamle, N. L. (18. November 2018). *Indian Journal of Pharmaceutical Science*. Pridobljeno iz Photodegradation of Methylcobalamin and Its Determination in a Commercial Formulation:  
<https://www.ijpsonline.com/articles/photodegradation-of-methylcobalamin-and-its-determination-in-a-commercial-formulation-3586.html>
- A. H. CHAMLE, N. L. (18. November 2018). Photodegradation of Methylcobalamin and Its Determination in a Commercial Formulation. *Indian J Pharm Sci* 2019;81(1), str. 57-62.
- Aleš Koščak. (15. junij 2022). *Diagnostični laboratorij*. Pridobljeno iz Vitamin B12:  
<https://diagnosticni-laboratorij.si/vitamin-b12/>
- Authority, E. F. (11. Junij 2015). *EFSA Journal*. Pridobljeno iz Scientific Opinion on Dietary Reference Values for cobalamin (vitamin B12):  
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2015.4150>
- Belitz H.D., G. W. (2009). *Maščobe*. Pridobljeno iz [nutris.org](https://www.nutris.org):  
<https://www.nutris.org/prehrana/abc-prehrane/osnovna-hranila/83-mascobe.html>
- Boyer, R. (2005). *Temelji biokemije. 2nd edition*. Ljubljana: Študentska založba: 634 str. Pridobljeno iz [nutris.si](https://www.nutris.si): <https://www.nutris.org/prehrana/abc-prehrane/osnovna-hranila/75-ogljikovi-hidrati.html>
- Christiana Paul. (12. junij 2022). *National Library of Medicine*. Pridobljeno iz Comparative Bioavailability and Utilization of Particular Forms of B12 Supplements With Potential to Mitigate B12-related Genetic Polymorphisms:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5312744/>
- Clinic, O. M. (17. Julij 2021). *Mayo Clinic*. Pridobljeno iz Vitamin B12:  
<https://www.mayoclinic.org/drugs-supplements-vitamin-b12/art-20363663>
- Dr. Deepak. (27. junij 2022). *Lab Training*. Pridobljeno iz How to read a chromatogram?:  
<https://lab-training.com/how-to-read-a-chromatogram/>
- Elin Röö. (13. junij 2022). *Cambridge Univeristy Press*. Pridobljeno iz Less meat, more legumes: prospects and challenges in the transition toward sustainable diets in Sweden: <https://www.cambridge.org/core/journals/renewable-agriculture-and-food-systems/article/less-meat-more-legumes-prospects-and-challenges-in-the-transition-toward-sustainable-diets-in-sweden/4B3B9B479B1B407B148D60860F77A088>

- Erickson, A. (3. September 2019). *Government of Western Australia - Department of Primary Industries and Regional Development: Agriculture and Food*. Pridobljeno iz Cobalt deficiency in sheep and cattle: <https://www.agric.wa.gov.au/livestock-biosecurity/cobalt-deficiency-sheep-and-cattle>
- European Medical Agency. (12. junij 1995). *European Medical Agency. Science Medicines Health*. Pridobljeno iz ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures>
- Gehad G. Mohamed, A. M. (2020). Simultaneous determination of some antidepressant drugs and vitamin B12 in pharmaceutical products and urine sample using HPLC method. *Journal of Chromatography, Volume 1150*, 122178. Pridobljeno iz Journal of Chromatography B.
- Green, R., Allen, L., Bjørke-Monsen, A., Brito, A., Guéant, J., Miller, J., . . . al., e. (29. Junij 2017, 3). Vitamin B(12) deficiency. *Nat. Rev. Dis. Primers*, str. 17040.
- HARVARD T. H. CHAN. (13. junij 2022). *Harvard education*. Pridobljeno iz Whole grains: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/what-should-you-eat/whole-grains/>
- Harvard T. H. Chan. (13. junij 2022). *Nutrition*. Pridobljeno iz The Healthy Plate: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/healthy-eating-plate/>
- Higdon, J. (2000). *Oregon State University - Linus Pauling Institute*. Pridobljeno iz Vitamin B12: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/vitamin-B12>
- Inštitut za nutricionistiko. (2021). *Prehrana.si. Nacionalni portal o hrani in prehrani*. Pridobljeno iz Vitamin B12: <https://www.prehrana.si/sestavine-zivil/vitamini/vitamin-b12>
- Inštitut za nutricionistiko. (12. junij 2022). *Prehrana.si. Nacionalni portal o hrani in prehrani*. Pridobljeno iz Vegetarijanci in vegani: <https://www.prehrana.si/moja-prehrana/drugi-prehranski-nasveti/vegetarijanci-in-vegani>
- ivboost.uk. (12. junij 2022). *ivboost.uk*. Pridobljeno iz The Four Types of Vitamin B12: Which One Is Right for You?: <https://ivboost.uk/4-types-of-vitamin-b12/>
- ivboost.uk. (12. junij 2022). *ivboost.uk*. Pridobljeno iz The Four Types of Vitamin B12: Which One Is Right for You?: <https://ivboost.uk/4-types-of-vitamin-b12/>
- Javno zdravje, N. i. (2021). *Kako do zdrave porcije obrokov*. Pridobljeno iz Skupaj za zdravje: <https://www.skupajzazdravje.si/zdrava-prehrana/zdrava-porcija-obrokov/>

Rea Doria Bergant, Tea Vovko. Veganstvo in vitamin B12

Karl August Folkers, D. H. (20. januar 2022). *Britannica*. Pridobljeno iz Britannica - vitamina B12, chemical compound:  
<https://www.britannica.com/science/vitamin-B12>

Kingsdale, O. ž. (2022). *Kingsdale Animal Hospital*. Pridobljeno iz Vitamina B12 (Cobalamin) Deficiency in Pets: Everything you need to know:  
<https://www.kingsdale.com/vitamin-b12-cobalamin-deficiency-in-pets>

Margaret E. Gregory, H. B. (1. Junij 2009). *Cambridge Core*. Pridobljeno iz The effect of ultra-high-temperature heat treatment on the content of thiamine, vitamin B6 and vitamin B12 of milk: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-dairy-research/article/abs/effect-of-ultrahightemperature-heat-treatment-on-the-content-of-thiamine-vitamin-b6-and-vitamin-b12-of-milk/0C05179FB1AB744A3453DF343F438CD7>

MedChemExpress. (14. junij 2022). *Master of Bioactive Molecules*. Pridobljeno iz Adenosylcobalamin: <https://en.wikipedia.org/wiki/Methylcobalamin>

Ministrstvo za zdravje. (22. junij 2022). *Prehranska dopolnila*. Pridobljeno iz Napotki glede prehranskih dopolnil:  
<https://www.gov.si/assets/ministrstva/MZ/DOKUMENTI/DJZ-Preventiva-in-skrb-za-zdravje/varnost-zivil-in-hrane/prehranska-dopolnila/Napotki-prehranskih-dopolnil-2021.pdf>

Nacionalni inštitut za javno zdravje. (14. junij 2022). *NIJZ*. Pridobljeno iz Referenčne vrednosti:  
[https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/referencne\\_vrednosti\\_2020\\_3\\_2.pdf](https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/referencne_vrednosti_2020_3_2.pdf)

Nagalla, S. (14. December 2021). *MedScape*. Pridobljeno iz MedScape - Pernicious Anemia: <https://emedicine.medscape.com/article/204930-overview>

Narmada P\*, V. L. (2013). RP-HPLC method development and validation for the determination of methylcobalamin and pregabalin in combined capsule dosage form. *Int. J. Res. Pharm. Sci*, 4(1), 25-29 .

Nguyen, S. (Julij-Avgust 2017). *The Rise of Vegan Culture*. Pridobljeno iz harvardmagazine.com: <https://www.harvardmagazine.com/2017/07/the-rise-of-vegan-culture>

NHS. (23. Maj 2022). *NHS*. Pridobljeno iz NHS - Symptoms:  
<https://www.nhs.uk/conditions/vitamin-b12-or-folate-deficiency-anaemia/symptoms/>

- NHS. (15. junij 2022). *NHS*. Pridobljeno iz Vitamin B12 or folate deficiency anaemia: <https://www.nhs.uk/conditions/vitamin-b12-or-folate-deficiency-anaemia/complications/>
- NIJZ, R. S. (6. julij 2022). *Centralna baza zdravil*. Pridobljeno iz Vitamin B12: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search?SearchView&Query=\(%5BSeznam](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search?SearchView&Query=(%5BSeznam)
- Osebje, M. C. (17. Julij 2021). *Mayo Clinic*. Pridobljeno iz Vitamin B12: <https://www.mayoclinic.org/drugs-supplements-vitamin-b12/art-20363663>
- Pokorn, D. (1997). *Beljakovine*. Pridobljeno iz nutris.org: <https://www.nutris.org/prehrana/abc-prehrane/osnovna-hranila/76-beljakovine.html>
- Pokorn, D. (1997). *Vitamini in minerali*. Pridobljeno iz nutris.org: <https://www.nutris.org/prehrana/abc-prehrane/osnovna-hranila/81-vitamini-in-minerali.html>
- Pokorn, D. (1997). *Vlaknine*. Pridobljeno iz nutris.org: <https://www.nutris.org/prehrana/abc-prehrane/osnovna-hranila/91-vlaknine.html>
- Prehrana.si. (15. junij 2022). *Prehrana.si*. Pridobljeno iz Vitamin B12: <https://www.prehrana.si/sestavine-zivil/vitamini/vitamin-b12>
- Pust, S. (18. Februar 2020). *Zakaj se več žensk odloči za veganstvo?* Pridobljeno iz Delo: <https://www.delo.si/magazin/zanimivosti/zakaj-se-vec-zensk-odloci-za-veganstvo/>
- Ribič, d. C. (2009). *Inštitut za varovanje zdravja*. Pridobljeno iz Priporočila za zdravo prehranjevanje. Cindi Slovenija: <https://www.oskrize.si/files/2021/09/PRIPORO%C4%8CILA-ZA-ZDRAVO-PREHRANJEVANJE.pdf>
- Risikobewertung, B. f. (2015). *Maximum levels for the addition of vitamin B12 to foods including food supplements*. Pridobljeno iz BfR: <https://www.bfr.bund.de/cm/349/maximum-levels-for-the-addition-of-vitamin-b12-to-foods-including-food-supplements.pdf>
- Semeco, A. (20. januar 2022). *Healthline*. Pridobljeno iz Healthline - Top 12 Foods That Are High in Vitamin B12: <https://www.healthline.com/nutrition/vitamin-b12-foods#foods-list>
- Sušnik, D. (8. Februar 2016). *Vegan.si*. Pridobljeno iz Živeti vegansko, Prehrana: <http://vegan.si/ziveti-vegansko/prehrana/>

- Tanšek, M. Ž. (oktober 2018). *Redke bolezni. Nacionalna kontaktna točka*. Pridobljeno iz Metilmalonska acidemija: <https://www.redkebolezni.si/redke-bolezni/metilmalonska-acidemija/>
- Tekin Guney, A. S. (23. November 2022). *IntechOpen*. Pridobljeno iz Epidemiology of Vitamin B12 Deficiency: <https://www.intechopen.com/chapters/50982>
- Tesařová, M. (27. December 2021). *KATERIH HRANILNIH SNOVI VEGANOM NAJPOGOSTEJE PRIMANJKUJE IN KAKO JIH DOPOLNITI?* Pridobljeno iz gymbeam.si: <https://gymbeam.si/blog/katerih-hranil-pri-veganih-najbolj-primanjkuje-in-kako-jih-dopolniti/>
- Time. (2022). *This Is Why Vegetarianism Didn't Catch On Until Recently*. Pridobljeno iz time.com: <https://time.com/4220270/vegetarianism-history-meathooked/>
- Tina Drobtinka. (5. julij 2022). *Drobtinka.si*. Pridobljeno iz 5 razlogov zakaj so žita pomemben del prehrane: <https://www.drobtinka.si/5-razlogov-zakaj-so-zita-pomemben-del-prehrane/>
- Tiran, N. (22. Marec 2016). *Raziskava o veganski skupnosti*. Pridobljeno iz Vegan.si: <http://vegan.si/clanki/raziskava-o-veganski-skupnosti/>
- unije, U. I. (25. oktober 2011). *Eur-Lex. Access to European Union Law*. Pridobljeno iz Uredba (EU) št. 1169/2011 Evropskega parlamenta in Sveta: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=CELEX:32011R1169>
- unije, U. I. (25. oktober 2011). *Eur-Lex. Access to European Union Law*. Pridobljeno iz Uredba (EU) št. 1169/2011 Evropskega parlamenta in SVeta: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=CELEX:32011R1169>
- Uradni list Evropske unije. (25. oktober 2011). *Eur-Lex. Access to European Union Law*. Pridobljeno iz Uredba (EU) št. 1169/2011 Evropskega parlamenta in Sveta: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=CELEX:32011R1169>
- Valens. (2021). *Valens*. . Pridobljeno iz Pogosta vprašanja.: <https://valens.si/valens-homocistein-stop/pogosta-vprasanja/>
- vegan.com. (13. junij 2022). *Vegan.com*. Pridobljeno iz Why go vegan?: <https://vegan.com/info/why/>
- Watanabe, F. (22. Maj 2002). *National Library of Medicine*. Pridobljeno iz Characterization and bioavailability of vitamin B12 - compounds from edible algae: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12656203/>
- Watanabe, Fumio. (1. November 2007). *Sage Journals. Experimental Biology and Medicine*. Pridobljeno iz Vitamin B12 Sources and Bioavailability: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/0703-mr-67>

Rea Doria Bergant, Tea Vovko. Veganstvo in vitamin B12

Wikimedia common. (14. junij 2022). *Hydroxocobalamin Injection*. Pridobljeno iz Hydroxocobalamin Injection:  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hydroxocobalamin\\_Injection.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hydroxocobalamin_Injection.jpg)

Wikimedia commons. (14. junij 2022). *Hydroxocobalamin Injection*. Pridobljeno iz Hydroxocobalamin Injection:  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hydroxocobalamin\\_Injection.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hydroxocobalamin_Injection.jpg)

Wikipedia. (14. junij 2022). *Wikipedia*. Pridobljeno iz Methylcobalamin:  
<https://en.wikipedia.org/wiki/Methylcobalamin>

Wikipedia. (14. junij 2022). *Wikipedia*. Pridobljeno iz Hydroxocobalamin:  
<https://en.wikipedia.org/wiki/Hydroxocobalamin>

Wikipedia. (14. junij 2022). *Wikipedia*. Pridobljeno iz Cyanocobalamin:  
<https://en.wikipedia.org/wiki/Cyanocobalamin>

Yamada, K. (2013). *Springer Science in Business Media Dordrecht*. Pridobljeno iz Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases:  
[yamada2013\\_Cobalt\\_role+in+health+and+disease.pdf](#)

## 11 VIRI SLIK

Vse slike, ki nimajo dodanih virov, so avtorske fotografije.

## 12 PRILOGE

### 12.1 ANKETNI VPRAŠALNIK

Razdelek 1 od 2

## Veganstvo in vitamin B12

Pozdravljeni, sva Tea Vovko in Rea Doria Bergant, dijakinji tretjega letnika Gimnazije Novo mesto, pripravljava raziskovalno nalogo o povezavi med vegansko prehrano in vitaminom B12. Pripravili sva kratko anketo in k sodelovanju ter izpolnjevanju le te vabiva vse vegane, saj bodo podatki, ki jih bova na ta način pridobili, za najino raziskavo ključni. Izpolnjevanje vam ne bo vzelo več kot 10 minut časa. Anketa je popolnoma anonimna, vaše odgovore bova kot statistične podatke uporabili izključno za raziskovalno nalogo. Že vnaprej se vama zahvaljujema za vaš prispevek, prosiva pa, da na anketo odgovarjate resno, saj nama boste le tako pomagali pri oblikovanju smiselnih zaključkov.

Spol: \*

Moški

Ženski

Starostna skupina: \*

0 - 18 let

19 - 30 let

31 - 40 let

41 - 50 let

> 50 let

Po razdelku 1 Naprej na naslednji razdelek

Razdelek 2 od 2

Veganstvo ⌵ ⋮

Sledi nekaj vprašanj o specifikah vaše hrane in prehranjevalnih navad.

Ali ste iz vaše prehrane poleg mesa in mesnih izdelkov popolnoma odstranili tudi vse ostale živalske produkte (npr. mleko, jajca, ...)? \*

Da

Ne

Če ste na prejšnje vprašanje odgovorili z "Ne," prosim navedite katere živalske produkte uživate.

Besedilo vprašanja z dolgim odgovorom

.....

Kakšni so bili vaši razlogi za prehod na vegansko prehrano? \*

Vegan/ka sem že celo svoje življenje.

Imam moralno-etične razloge (odnos do živali...).

Vegan/ka sem zaradi zdravstvenih razlogov.

Moji razlogi so povsem osebne narave.

Drugo ...

Koliko časa se že prehranujete vegansko? \*

- manj kot 5 let
- med 5 in 10 let
- več kot 10 let
- več kot 20 let

Ste seznanjeni z dejstvom, da zaradi veganske prehrane lahko pride do pomanjkanja nekaterih \*  
hranil (cink, železo, predvsem vitamin B12)?

- DA
- NE
- To ne drži, saj je veganska prehrana veliko bolj zdrava od običajne in je z njo možno pridobiti vsa potrebn...

Kje ste pridobili informacije o tem, katera hranila vam z vegansko prehrano lahko primanjkujejo?

- od sorodnikov, prijateljev oziroma znancev
- iz strokovne literature (knjige, članki)
- iz spletnih virov namenjenih veganom (npr. Vegan.si)
- preko socialnih omrežij
- veganska prehrana ne povzroča nikakršnih pomanjkanj hranil
- Drugo ...

Eden od pomembnejših hranil, ki ga v veganski prehrani lahko primanjkuje, je vitamin B12, ker ga najdemo izključno v živilih živalskega izvora. Katere zdravstvene težave menite, da pomanjkanje povzroča? (označite lahko več odgovorov)

- slabokrvnost ali anemija
- utrujenost
- izguba apetita
- težave s prebavo (driska ali zaprtje)
- psihične težave (živčnost, depresija)
- slabšanje vida
- izguba spomina

Kako v svoji veganski prehrani zagotovite, da dobite dovolj vitamina B12? \*

- prepričan/ana sem, da ga v moji prehrani ne manjka
- svojo prehrano skrbno načrtujem in pazim, da zaužijem dovolj rastlinskih živil z vitaminom B12
- v svojo prehrano vključujem živila, bogata z vitaminom B12 (algge, gobe...)
- uživam živila, obogatena z dodanim vitaminom B12
- uživam prehranska dopolnila z vitaminom B12
- nisem pozoren/na nato
- Drugo ...

Če uživate veganska živila, bogata z vitaminom B12, vas prosiva, da čim bolj natančno napišete katera.

Besedilo vprašanja z dolgim odgovorom

Če uživate prehranska dopolnila za nadomeščanje B12, prosiva napišite katera. (npr. Jamieson, B12...)

Besedilo vprašanja z dolgim odgovorom

Če uživate prehranska dopolnila z B12, kje jih kupujete?

- vedno v lekarnah
- v lekarnah ali specializiranih prodajalnah (Sanolabor, DM, Sensilab...)
- v večjih običajnih prodajalnah (Mercator, Spar...)
- preko spletne prodaje
- kupim jih tam, kjer jih dobim ceneje

Kupujete vedno enaka ali različna prehranska dopolnila z vitaminom B12?

- DA, vedno enaka
- NE, znamka ali firma mi ni pomembna, pomembno je kaj vsebuje
- Drugo ...

Ali se pri nakupu vitamina B12 pozanimате o njegovi kakovosti?

- DA, za svojega sem prvič dobil/a analizni certifikat
- DA, po kakovosti vprašam prodajalce in zahtevam certifikat, če je na voljo
- DA, glede kakovosti se zanesem na informacije prodajalcev
- DA, pozanimal/a sem se pri prijateljih in znancih
- NE, saj morajo biti kakovostni, če se prodajajo za dopolnitev zdrave prehrane
- NE, ker ne zaupam prodajalcem in se ravnám po tem, kar ustreza meni

## 12.2 SPECIFIKACIJI STANDARDOV

### 12.2.1 CIANOKOBALAMIN

**SIGMA-ALDRICH**<sup>®</sup>

[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

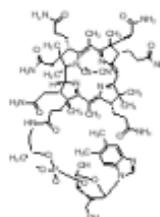
Email USA: [techserv@sial.com](mailto:techserv@sial.com)

Outside USA: [eurtechserv@sial.com](mailto:eurtechserv@sial.com)

## Product Specification

Product Name:  
Vitamin B12 - ≥98%

Product Number: **V2876**  
CAS Number: 68-19-9  
MDL: MFCD00151092  
Formula: C<sub>63</sub>H<sub>88</sub>CoN<sub>14</sub>O<sub>14</sub>P  
Formula Weight: 1,355.37 g/mol  
Storage Temperature: 2 - 8 °C



### TEST

### Specification

Appearance (Color)	Red to Brown
Appearance (Form)	Powder
Solubility (Color)	Dark Red
Solubility (Turbidity)	Solution
50 mg/ml, H <sub>2</sub> O	
Loss on Drying	< 12 %
Infrared spectrum	Conforms to Structure
Purity (HPLC)	> 98 %
Recommended Retest Period	-----
3 years	

Specification: PRD.1.ZQ5.10000006322

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at [Sigma-Aldrich.com](http://Sigma-Aldrich.com). For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

## 12.2.2 METILKOBALAMIN

**SIGMA-ALDRICH®**

[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

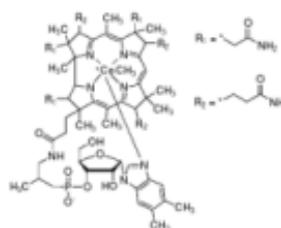
Email USA: [techserv@sial.com](mailto:techserv@sial.com)

Outside USA: [eurtechserv@sial.com](mailto:eurtechserv@sial.com)

### Product Specification

Product Name:  
Methylcobalamin - vitamin B12 analog

Product Number: **M9756**  
CAS Number: 13422-55-4  
MDL: MFCD00082483  
Formula: C<sub>63</sub>H<sub>91</sub>CoN<sub>13</sub>O<sub>14</sub>P  
Formula Weight: 1,344.38 g/mol  
Storage Temperature: -20 °C



#### TEST

#### Specification

Appearance (Color)	Red to Very Dark Red
Appearance (Form)	Powder
Solubility (Color)	Red to Very Dark Red
Solubility (Turbidity)	Clear
50 mg/mL, EtOH	
Water (by Karl Fischer)	< 12 %
Purity (HPLC)	> 97 %
Identity	Pass
Chromatographic	

Specification: PRD.1.ZQ5.10000026043

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at [Sigma-Aldrich.com](http://Sigma-Aldrich.com). For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.