

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS  
FARMACIJOS FAKULTETAS  
ANALIZINĖS IR TOKSIKOLOGINĖS CHEMIJOS KATEDRA

**AGNĖ SALOKAITĖ**

**ĮVAIRIŲ LIETUVOJE NOTIFIKUOTŲ MAISTO PAPILDŲ, SAVO SUDĖTYJE  
TURINČIŲ L – KARNITINO, TYRIMAS TAIKANT CHROMATOGRAFINIUS  
ANALIZĖS METODUS**

**Magistro baigiamasis darbas**

**Darbo vadovas**

Prof. Andrejus Ževžikovas

KAUNAS, 2019

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS  
FARMACIJOS FAKULTETAS  
ANALIZINĖS IR TOKSIKOLOGINĖS CHEMIJOS KATEDRA

**TVIRTINU:**

Farmacijos fakulteto dekanė Ramunė Morkūnienė

Data

**ĮVAIRIŲ LIETUVOJE NOTIFIKUOTŲ MAISTO PAPILDŲ, SAVO SUDĖTYJE TURINČIŲ  
L – KARNITINO, TYRIMAS TAIKANT CHROMATOGRAFINIUS ANALIZĖS METODUS**

**Magistro baigiamasis darbas**

Darbo vadovas

Prof. Andrejus Ževžikovas

Data

Recenzentas

Darbą atliko

Magistrantė

Agnė Salokaitė

Data

Data

KAUNAS, 2019

## TURINYS

SANTRAUKA .....	5
SUMMARY .....	6
SANTRUMPOS .....	7
ĮVADAS.....	9
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	12
1.1. L – karnitino charakteristika.....	12
1.2. Priemaišos, pasitaikančios L – karnitino maisto papilduose .....	14
1.3. L – karnitino maisto papildų paskirtis .....	15
1.3.1. L – karnitinas ir II tipo cukrinis diabetas .....	16
1.3.2. L – karnitino vaidmuo siekiant sumažinti nuovargį .....	17
1.3.3. L – karnitino poveikis fiziniam našumui .....	18
1.3.4. L – karnitino reikšmė autizmo terapijai .....	19
1.3.5. Antioksidacinis L – karnitino poveikis .....	19
1.4. Metodai, taikomi L – karnitino kokybinei ir kiekybinei analizei.....	20
2. TYRIMO METODIKA.....	24
2.1. Tyrimo objektas .....	24
2.1.1. Maisto papildų atranka.....	24
2.1.2. Tyrimui pasirinktų maisto papildų sudėtis.....	25
2.2. Tyrimo metodai .....	25
2.3. Priemonės ir prietaisai .....	25
2.4. Efektyvioji skysčių chromatografija.....	26
2.4.1. Aparatūra.....	26
2.4.2. Medžiagos .....	26
2.4.3. Chromatografavimo salygos .....	27
2.4.4. Standartinio tirpalo paruošimas .....	27
2.4.5. Kapsulių mėginių paruošimas .....	27
2.5. Dujų chromatografija.....	27
2.5.1. Aparatūra.....	28
2.5.2. Medžiagos .....	28

2.5.3. Chromatografavimo sąlygos .....	28
2.5.4. Standartinio tirpalo paruošimas .....	29
2.5.4.1. Standartinio tirpalo derivatizacijos procedūra.....	29
2.5.5. Kapsulių mėginių paruošimas .....	30
2.5.5.1. Kapsulių mėginių derivatizacijos procedūra .....	30
2.6. Metodų validacija .....	30
2.6.1. Specifiškumas .....	30
2.6.2. Glaudumas .....	31
2.6.3. Tiesiškumas.....	31
2.6.4. Aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribos .....	31
2.7. Duomenų analizės metodai.....	32
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	33
3.1. L – karnitino kokybinė ir kiekybinė analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu ...	33
3.1.1. Chromatografavimo sąlygų parinkimas .....	33
3.1.2. Efektyviosios skysčių chromatografijos metodikos validacija .....	33
3.1.2.1. Efektyviosios skysčių chromatografijos specifiškumas .....	33
3.1.2.2. Efektyviosios skysčių chromatografijos glaudumas .....	35
3.1.2.3. Efektyviosios skysčių chromatografijos tiesiškumas.....	35
3.1.2.4. L – karnitino aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribos, taikant efektyviosios skysčių chromatografijos metodą.....	36
3.1.3. L – karnitino maisto papildų kokybinės sudėties analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu .....	37
3.1.4. L – karnitino maisto papildų kiekybinės sudėties analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu .....	40
3.2. L – karnitino kokybinė ir kiekybinė analizė dujų chromatografijos metodu .....	42
3.2.1. Dujų chromatografijos metodikos validacija.....	42
3.2.1.1. Dujų chromatografijos specifiškumas .....	42
3.2.1.2. Dujų chromatografijos glaudumas .....	44
3.2.2. L – karnitino maisto papildų kokybinės sudėties analizė dujų chromatografijos metodu ...	45
3.2.3. L – karnitino maisto papildų kiekybinės sudėties analizė dujų chromatografijos metodu ...	46
3.3. Dviejų skirtingų metodų, pasirinktų L – karnitino kokybinei ir kiekybinei analizei, palyginimas .....	48
IŠVADOS.....	50
PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS.....	51
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	52

## SANTRAUKA

A. Salokaitės magistro baigiamasis darbas/ mokslinis vadovas prof. A. Ževžikovas; Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Farmacijos fakulteto Analizinės ir toksikologinės chemijos katedra. – Kaunas.

**Pavadinimas:** Įvairių Lietuvoje notifikuotų maisto papildų, savo sudėtyje turinčių L – karnitino, tyrimas taikant chromatografinius analizės metodus.

**Darbo tikslas:** atlikti pasirinktų Lietuvoje notifikuotų maisto papildų, savo sudėtyje turinčių L – karnitino, kokybinę ir kiekybinę analizę efektyviosios skysčių chromatografijos ir dujų chromatografijos metodais ir palyginti gautus rezultatus.

**Tyrimo objektas:** penki skirtingi Lietuvos Respublikoje notifikuoti maisto papildai, savo sudėtyje turintys L – karnitino, įsigyti šalies vaistinėse ir sportininkams skirtose parduotuvėse.

**Tyrimo metodai:** efektyviosios skysčių chromatografijos atveju naudota sistema, sudaryta iš chromatografo Shimadzu Nexera X2 ir fotodiodų matricos detektoriaus SPD – M20A, derinama su Hydrosphere C<sub>18</sub> kolonėle (ilgis – 250 mm, vidinis diametras – 4,0 mm, sorbento dalelių dydis – 5 μm), judančiąja faze pasirenkant 70 mM dinatrio vandenilio fosfato tirpalą, kurio pH reguliuojamas naudojant fosforo rūgštį ir lygus 2,1. Dujų chromatografijos atveju pasitelkta sistema, sudaryta iš chromatografo „Shimadzu GCMS – QP2010 Ultra system“ ir masių spektrometrijos detektoriaus, derinama su Rt – βDEXsa kolonėle (ilgis – 30 m, vidinis diametras – 0,25 mm, sorbento dalelių dydis – 0,25 μm), nešančiomis dujomis pasirenkant helio dujas.

**Rezultatai ir išvados:** abu tyrimo metu naudoti chromatografiniai metodai pasižymėjo specifiskumu ir glaudumu, efektyviajai skysčių chromatografijai buvo būdingas tiesiškumas, aptikimo ribai esant 104,82 ng/ml, o kiekybinio nustatymo ribai – 317,63 ng/ml. Abiem metodais visuose pasirinktuose maisto papilduose nustatytas L – karnitinas ir neidentifikuota priemaiša, kuri, spėjama, yra krotonoilbetainas arba D – karnitinas. Nei vieno metodo taikymo atveju nustatyti L – karnitino kiekiai nei vieno papildu sudėtyje neatitiko gamintojų nurodomų kiekių. Skirtumai tarp dviem skirtingais metodais gautų L – karnitino kiekybinės analizės rezultatų pasirinktuose maisto papilduose svyravo nuo 0,20 miligramų kapsulėje iki 53,73 miligramų kapsulėje.

**Raktiniai žodžiai:** L – karnitinas, maisto papildai, efektyvioji skysčių chromatografija, dujų chromatografija, krotonoilbetainas, D – karnitinas.

## SUMMARY

**Title:** Determination of L – carnitine in various food supplements notified in Lithuania using chromatographic analysis methods.

**Aim:** To perform qualitative and quantitative analysis of selected food supplements containing L – carnitine notified in Lithuania using high – performance liquid chromatography and gas chromatography and to compare the results obtained.

**Object:** five different food supplements containing L – carnitine notified in Lithuania which were purchased from local pharmacies and from specialized shops for athletes.

**Methods:** the high – performance liquid chromatography analysis was conducted on a system consisting of Shimadzu Nexera X2 chromatograph equipped with SPD – M20A photodiode array detector and Hydrosphere C<sub>18</sub> column (length – 250 mm, inner diameter – 4,0 mm, particle size – 5 µm), using 70 mM disodium hydrogen phosphate which pH was adjusted to 2,1 by phosphoric acid as a mobile phase. Gas chromatography analysis was carried out using Shimadzu GCMS – QP2010 Ultra system chromatograph coupled to mass spectrometry detector, Rt – βDEXsa column (length – 30 m, inner diameter – 0,25 mm, particle size – 0,25 µm) and helium as a carrier gas.

**Results and conclusions:** both chromatographic methods chosen for this study were proved to be specific and precise, high – performance liquid chromatography showed linearity with limit of detection of 104,82 ng/ml and limit of determination of 317,63 ng/ml. Qualitative analysis conducted by both methods confirmed the presence of L – carnitine in all selected food supplements, furthermore, an unidentified impurity, which is supposed to be crotonoylbetaine or D – carnitine, was observed. None of the results of quantitative analysis of chosen food supplements conducted by both chromatographic methods met the quantity of L – carnitine specified by the manufacturer. The differences between the results of L – carnitine quantitative analysis in selected food supplements observed using two chromatographic methods varied from 0,20 mg per capsule to 53,73 mg per capsule.

**Keywords:** L – carnitine, food supplements, high – performance liquid chromatography, gas chromatography, crotonoylbetaine, D – carnitine.

## SANTRUMPOS

**Acetyl CoA** – acetilo kofermentas A (angl. *Acetyl coenzyme A*)

**Apo A1** – apolipoproteinas A1

**Apo B – 100** – apolipoproteinas B – 100

**ASS** – autizmo spektro sutrikimas

**BAOT** – bendra antioksidacinė talpa

**BFI** – trumpasis nuovargio inventorius (angl. *Brief Fatigue Inventory*)

**CARS** – vaikystės autizmo vertinimo skalė (angl. *Childhood Autism Rating Scale*)

**CD** – cukrinis diabetas

**DC** – dujų chromatografija

**EMA** – Europos vaistų agentūra (angl. *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*)

**EPC** – efektyvioji plonasluoksnė chromatografija

**ESC** – efektyvioji skysčių chromatografija

**FDA** – Maisto ir vaistų administracija (angl. *Food and Drug Administration*)

**FEMCF** – 9 – fluorenilmetil chloroformiatas

**IGRR** – ilgos grandinės riebalų rūgštys

**IR** – infraraudonieji spinduliai

**JAV** – Jungtinės Amerikos Valstijos

**k./d.** – kartai per dieną

**KE** – kapiliarinė elektroforezė

**LJD** – liepsnos jonizacijos detektorius

**LJG MS** – linijinės jonų gaudyklės masių spektrofotometrija

**LKLT** – L – karnitino L – tartratas

**Lp A** – lipoproteinas A

**LR** – Lietuvos Respublika

**LRR** – laisvosios riebalų rūgštys

**MGPM** – metabolizmo greitis poilsio metu

**MS/MS** – tandeminė masių spektrometrija

**MTBSTFA** – N – metil – N – (tert – butildimetilsilil)trifluoroacetamidas

**MTL** – mažo tankio lipoproteinai

**NSS** – nuovargio sunkumo skalė

**SSN** – santykinis standartinis nuokrypis

**ŠKS** – širdies ir kraujagyslių sistema

**UV** – ultravioletinės šviesos spinduliuotė

**VMVT** – Valstybinė maisto ir veterinarijos tarnyba

**ŽD** – žiedinis dichroizmas

## IVADAS

L – karnitinas, kaip maisto papildų aktyvusis komponentas, gamintojų pasirenkamas dėl atliekamų funkcijų žmogaus medžiagų apykaitos metu, kurių pagrindinė – ilgos grandinės riebalų rūgščių pernaša iš ląstelių citozolio į mitochondrijas [6, 12, 13, 16, 21, 29, 39]. Įvairiose užsienio šalyse atliktų klinikinių tyrimų metu stebėtų rezultatų dėka L – karnitino maisto papildai mokslinių publikacijų autorių rekomenduojami II tipo cukriniu diabetu sergančių pacientų, nuo autizmo kenčiančių vaikų ar, dėl antioksidacinio poveikio, sveikų gyventojų mitybos racionui papildyti [9, 15, 17, 24, 27].

Tuo tarpu Lietuvoje notifikuoti maisto papildai, savo sudėtyje turintys L – karnitino, pateikiami pabrėžiant teigiamą tokių papildų poveikį fiziniam našumui, mat ant jų pakuočių pateikiamuose aprašymuose L – karnitinas įvardijamas kaip „riebalų degintojas“ (angl. *fat burner*) arba kaip priemonė, kuri gali padėti sumažinti kūno masę. Faktas, jog L – karnitino reikšmė fizinio našumo ar energetinių substratų sunaudojimo didinimui nėra pilnai įrodyta klinikinių studijų metu, nesutrukdė L – karnitino maisto papildams įsitvirtinti Lietuvos maisto papildų, skirtų sportininkams, rinkoje [20, 21]. Didžiaja dalimi Lietuvoje notifikuotų maisto papildų, savo sudėtyje turinčių L – karnitino, prekiaujama ne vaistinėse, o į sportininkus orientuotose parduotuvėse, be to, ant jų pakuočių ar viešojo erdvėje pateikiamuose aprašymuose dėl šių maisto papildų patariama pasikonsultuoti su treneriu, o jų vartojimą derinti su treniruočių režimu. Naujaisiais bendrovės „Spinter tyrimai“ atrankinės kiekybinės studijos duomenimis, sportuojančių ar besimankštinančių gyventojų Lietuvoje daugėja, todėl negalima atmesti tikimybės, jog augantis susidomėjimas sportu gali būti lydimas didėjančio sportininkams siūlomų maisto papildų vartojimo [3]. Siekiant užtikrinti sportinių rezultatų našumui padidinti rekomenduojamų maisto papildų, tame tarpe ir L – karnitino, kokybę, didelę reikšmę įgyja metodų, tinkamų L – karnitino atpažinimui ir kiekybiniam nustatymui maisto papilduose, paieškos.

Stuko R. ir Dobrovolskij V. (2018) Lietuvoje atliktas tyrimas, kuriame dalyvavo 1012 respondentų, parodė, kad daugiau nei pusė apklaustųjų – 59,4 % – vartoja maisto papildus [2]. Iš šios studijos rezultatų išplaukia išvada, jog ant kiekvieno Lietuvoje notifikuoto maisto papildų pakuotės nurodomų aktyviųjų komponentų identifikacijos ir kiekybinio vertinimo tyrimai yra aktualūs. Būtent L – karnitino savo sudėtyje turinčių maisto papildų analizė yra ypač svarbi dar ir dėl šio junginio chiralizmo sąlygotos toksiškumo pasižyminčios priemonės patekimo į maisto papildus rizikos, įpareigojančios paliesti ne tik kokybės, bet ir papildų saugumo klausimus [25].

Norint užtikrinti tik kokybiškų, saugių ir naudingų gyventojų sveikatai maisto papildų, savo sudėtyje turinčių L – karnitino, vartojimą, svarbu pritaikyti metodus, tinkančius šios medžiagos kokybinei ir kiekybinei analizei. Tarp užsienio autorių mokslinėje literatūroje aprašomų šiam siekiui įgyvendinti pasitelkiamų priemonių pirmauja chromatografiniai tyrimo metodai, dažniausias iš jų – efektyvioji skysčių chromatografija (ESC) [7, 30, 34, 39]. Dėl tokių savybių, kaip paprastumas, jautrumas, greitas atlikimas du chromatografiniai metodai – ESC ir dujų chromatografija (DC) buvo pasirinkti šio eksperimento metu, kurio tikslas – atlikti pasirinktų Lietuvoje notifikuotų maisto papildų, savo sudėtyje turinčių L – karnitino, kokybinę ir kiekybinę analizę efektyviosios skysčių chromatografijos ir dujų chromatografijos metodais ir palyginti gautus rezultatus.

## DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

### Darbo tikslas:

- Atlikti pasirinktų Lietuvoje notifikuotų maisto papildų, savo sudėtyje turinčių L – karnitino, kokybinę ir kiekybinę analizę efektyviosios skysčių chromatografijos ir dujų chromatografijos metodais ir palyginti gautus rezultatus.

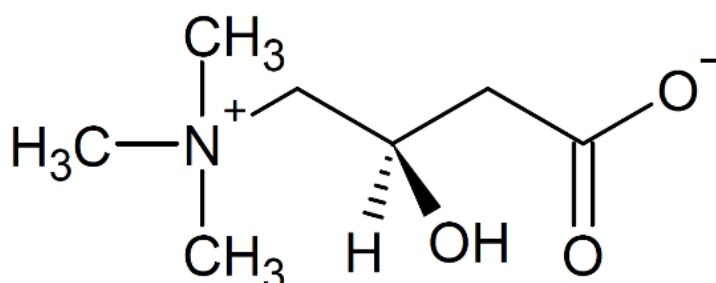
### Darbo uždaviniai:

1. Naudojant pritaikytą ir validuotą efektyviosios skysčių chromatografijos metodiką, atlikti L – karnitino kokybinį ir kiekybinį nustatymą pasirinktuose Lietuvoje notifikuotuose maisto papilduose.
2. Naudojant pritaikytą ir validuotą dujų chromatografijos metodiką, atlikti L – karnitino kokybinį ir kiekybinį tyrimą pasirinktuose Lietuvoje notifikuotose maisto papilduose.
3. Palyginti efektyviosios skysčių chromatografijos ir dujų chromatografijos metodikas bei šiais dviem chromatografiniais metodais gautus L – karnitino maisto papildų kiekybinės sudėties tyrimų rezultatus.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. L – karnitino charakteristika

L – karnitinas (levokarnitinas) (1 pav.) – tai į B grupės vitaminus panašus chiralinis junginys, kai kurių mokslininkų įvardijamas kaip nebaltyminė aminorūgštis [6, 7, 14, 21, 25, 26, 29, 31, 32], žmogaus organizme sintetinamas iš dviejų aminorūgščių lizino ir metionino. L – karnitinas buvo atrastas 1905 – iais metais ir pavadintas vitaminu B<sub>T</sub>, toks šio junginio pavadinimas kartais sutinkamas ir šiomis dienomis [25]. Aptariant L – karnitino fizikines savybes pažymėtina, jog tai yra baltos arba beveik baltos spalvos kristaliniai milteliai arba bespalviai higroskopiški kristalai, kurie laisvai tirpsta vandenyje, tirpsta šiltame 96 % etanolyje ir praktiškai netirpsta acetone [14].



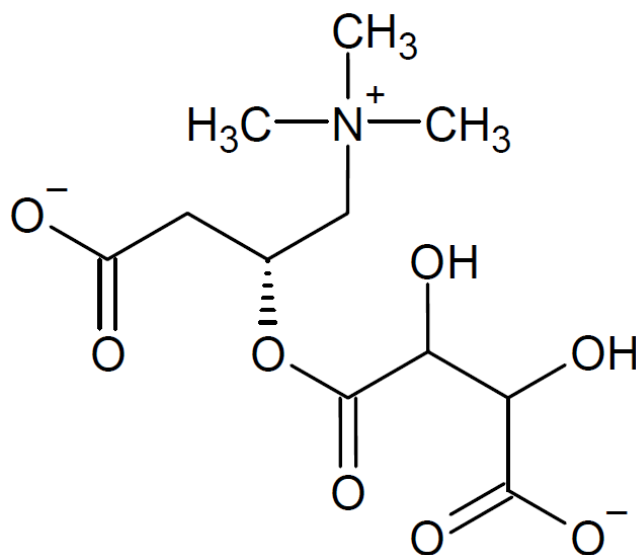
1 pav. L – karnitinas. Parengta pagal Ph. Eur. 9.0 [14]

Pagrindinė L – karnitino fiziologinė funkcija yra ilgos grandinės riebalų rūgščių (IGRR) pernaša iš ląstelių citozolio į mitochondrijas per vidinę mitochondrijų membraną [6, 12, 13, 16, 21, 29, 39]. Mitochondrijose vyksta IGRR oksidacija, kurios rezultatas – energijos atpalaidavimas, šis procesas ypač svarbus širdies ir griaučių skersaruožiuose raumenyse, kuriuose riebalų rūgštys atlieka pagrindinio energijos atpalaidavimo substrato vaidmenį [6, 7, 12, 16, 21, 29]. Taip pat L – karnitinas dalyvauja riebalų rūgščių β – oksidacijos procese, bei acetilo kofermento A (angl. *Acetyl coenzyme A* (*Acetyl – CoA*) ir kofermento A (*CoA*) koncentracijų santykio *acetyl – CoA/CoA* mitochondrijose reguliacijoje, peroksisomose vykstančioje RR oksidacijoje ir ketoninių kūnų sintezėje [12, 13, 21, 25, 29, 36].

Egzistuoja dvejopi L – karnitino šaltiniai: šis junginys yra sintetinamas žmogaus (bei daugelio kitų eukariotų) organizme bei gali būti gaunamas iš aplinkos su maistu [25, 29]. Būtent dėl fakto, jog L – karnitinas yra sintetinamas žmogaus kepenyse, smegenyse ir inkstuose, ši medžiaga negali būti priskiriama prie vitaminų [21, 26, 33]. Daugiausia L – karnitino yra tokiuose maisto šaltiniuose, kaip mėsa ir pieno produktai, kur kas mažiau jo randama vaisiuose, daržovėse, grūduose [25, 29]. Be to, L – karnitino gali būti dedama į kūdikiam skirtus mišinius [5, 10].

Suaugusio žmogaus organizme yra maždaug 25 g L – karnitino, o junginio dienos poreikis svyruoja nuo 0,3 mg iki 1,9 mg vienam kilogramui kūno masės [21, 29]. Teigiama, jog L – karnitino sintezė ir visavalgė dieta, kurios dėka gaunama nuo 100 mg iki 300 mg šio junginio per dieną, aprūpina žmogaus organizmą jo reikmėms pakankamu L – karnitino kiekiu [25]. Literatūros šaltiniuose galima aptikti šiuo faktu pagrįstų teiginių, bylojančių, jog L – karnitino maisto papildų poreikis nėra pilnai įrodytas, tačiau klinikinių tyrimų, plačiau aprašomų skirsnyje *L – karnitino maisto papildų paskirtis*, rezultatai liudija, jog tam tikrų būklių atvejais L – karnitino maisto papildai gali prisidėti prie žmogaus sveikatos pagerinimo [25]. L – karnitino maisto papildų paros dozė nėra nustatyta, o su šiuo junginiu atliktuose klinikiniuose eksperimentuose L – karnitino dozė įvairuoja nuo 1 g iki 6 g [25].

Į Lietuvos Respublikoje (LR) notifikuotų maisto papildų, savo sudėtyje turinčių L – karnitino, sąrašą patenka įvairūs maisto papildai, kuriems būdingos trys skirtingos farmacinės formos – kapsulės, geriamieji tirpalai (gėrimai) ir tabletės [4]. Užsienio šalių literatūroje be šių dažniausiai sutinkamų L – karnitino maisto papildų farmacinių formų taip pat aprašomi milteliai geriamajam tirpalui, bei tokios mažiau įprastos papildų formos, kaip injekciniai tirpalai ar net sausainiai [21, 31]. Į maisto papildus L – karnitinas gali būti įvedamas grynas arba L – karnitino L – tartrato (LKLT) pavidalu. LKLT (2 pav.) – tai druska, sudaryta iš L – karnitino ir vyno rūgšties, maisto papildų gamyboje mėgstama dėl geresnės nei L – karnitino absorbcijos iš virškinamojo trakto [19, 30].

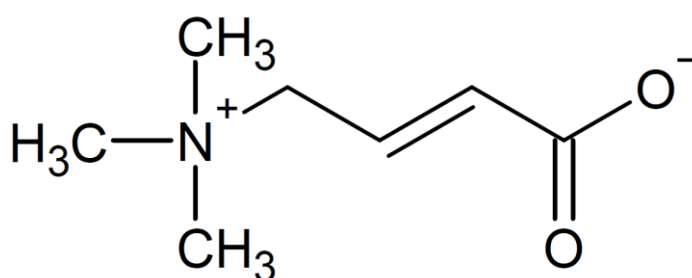


2 pav. L – karnitino L – tartratas. Parengta pagal Qadir M. A. ir kt. (2015) [30]

## 1.2. Priemaišos, pasitaikančios L – karnitino maisto papilduose

Europos farmakopėjoje reglamentuojamos keturios skirtingos L – karnitino priemaišos, iš kurių viena yra specifikuota, o likusios – nespecifikuotos [14]. Vadovaujantis faktu, jog nespecifikuotų priemaišų kiekiai L – karnitino farmaciniuose produktuose gali būti nepakankamai dideli, kad būtų įmanoma juos aptikti bei iš to išplaukiančiu Europos farmakopėjos teiginiu, jog jų identifikacija nėra būtina, šiame darbe plačiau pristatyti pasirinkta specifikuotą L – karnitino priemaišą krotonoilbetainą (3 pav.) [14].

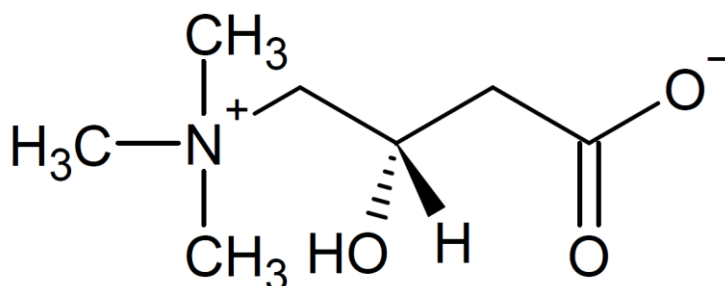
Mokslinėje literatūroje krotonoilbetainas yra apibūdinamas kaip pagrindinė L – karnitino priemaiša ir skilimo produktas [7, 18, 22, 39]. Teigiama, jog, dažniausiai, šio junginio kiekis farmaciniuose produktuose, savo sudėtyje turinčiuose L – karnitino, gali būti labai nedidelis ir nesiekti net 1 % aktyviojo komponento (vaistų atveju – veikliosios medžiagos) kiekio [18]. Nepaisant to, krotonoilbetainas gali lemti klaidingą kiekybinės L – karnitino analizės rezultatų interpretaciją, mat ši priemaiša pasižymi žymiai didesne UV absorbcijos koeficiento skaitine reikšme nei L – karnitinas [18, 22]. Pavyzdžiui, kai kuriose mokslinėse publikacijose minima, jog krotonoilbetaino ultravioletinės šviesos spinduliuotės (UV) absorbcijos koeficientas, esant 225 nm šviesos bangos ilgiui, yra maždaug 80 kartų didesnis už L – karnitino [7, 18]. Kitame šaltinyje aiškinama, jog L – karnitino skilimo produkto struktūroje esantys du dvigubieji ryšiai sąlygoja 200 kartų stipresnę krotonoilbetaino absorbciją [22]. Šiuo atveju pateikiamas pavyzdys, bylojantis, jog 0,01 % krotonoilbetaino koncentracija farmaciniame produkte gali klaidingai padidinti L – karnitino kiekybinės analizės rezultatą 2 % [22].



3 pav. Krotonoilbetainas. Parengta pagal Khoshkam R. ir kt. (2014) [39]

Darbo autorės manymu, nuo L – karnitino maisto papildų cheminio grynumo aptarimo neatsiejamas ir enantiomerinio grynumo aprašymas. Karnitinas apskritai gali egzistuoti dviejų skirtingų izomerų, vadinamų enantiomerais, pavidalu [25]. Gamtoje karnitinas sutinkamas tik L – karnitino pavidalu, o dešiniojo šviesos poliarizacijos plokštumos sukimo enantiomeras D – karnitinas (4 pav.) yra sintetinis izomeras [25]. D – karnitino arba raceminio mišinio įvedimas gali toksiškai paveikti žmogaus organizmą, mat D – karnitinas yra ne tik terapiškai neaktyvus, bet ir gali sutrikdyti

natūralią L – izomero funkciją [6, 25, 31, 32]. Tikima, jog D – karnitinas toksiškai veikia biocheminius procesus slopindamas karnitino acetiltransferazę [6, 39]. Be to, šis enantiomeras yra ypač pavojingas širdies ir kraujagyslių sistemos ligomis sergantiems pacientams [31]. Jungtinių Amerikos Valstijų (JAV) Maisto ir vaistų administracija (angl. *Food and Drug Administration (FDA)*) ir Europos vaistų agentūra (angl. *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA)*) reikalauja vaistų ir maisto papildų gamybos tik naudojant aktyviosios formos enantiomera [32]. Nepaisant to, esama pranešimų apie atvejus, kuomet, atliekant maisto papildų ar net vaistų, savo sudėtyje turinčių karnitino, kokybinę ir kiekybinę analizę, nustatyta, jog L – karnitinas buvo pakeistas racematu [31, 32].



4 pav. D – karnitinas. Parengta pagal de Andrés F. ir kt. (2010) [7]

### 1.3. L – karnitino maisto papildų paskirtis

L – karnitinas gali prisidėti prie širdies ir kraujagyslių sistemos (ŠKS) ligų atsiradimo II tipo cukriniu diabetu (CD) sergantiems pacientams rizikos sumažinimo, pavyzdžiui, moduliudamas oksidacinį stresą [15, 24]. Be to, esama duomenų, kad L – karnitinas gali padidinti šia liga sergančiųjų bei pacientų, kuriems nustatyta priešdiabetinė būklė, organizmo jautrumą insulinui [27]. Taip pat buvo nustatyta statistiškai reikšminga koreliacija tarp L – karnitino koncentracijos kraujo serume ir autizmo simptomų pagerėjimo bei tarp L – karnitino koncentracijos kraujo plazmoje ir antioksidacinių fermentų aktyvumo padidėjimo [9, 17]. Tuo tarpu klinikinių tyrimų rezultatai L – karnitino poveikio nuovargiui ir fiziniam našumui klausimais yra gana prieštaringi [8, 11, 20, 41].

### 1.3.1. L – karnitinas ir II tipo cukrinis diabetas

Pagrindinis ŠKS ligų rizikos veiksnys – mažo tankio lipoproteinų (MTL) cholesterolis – yra ypač pavojingas cukriniu diabetu sergantiems pacientams, mat hiperglikemija vaidina svarbų vaidmenį šio cholesterolio oksidacijoje [28]. L – karnitinas apsaugo ląsteles nuo MTL cholesterolio oksidaciją sukeliančio oksidacinio streso, šio proceso metu susidarancio azoto oksido, reguliuoja ląstelinį kvėpavimą ir fermentų, padedančių užkirsti kelią oksidaciniams pažeidimams, aktyvumą [24]. L – karnitino palankų oksidacinio streso moduliavimą iliustruoja Katanijoje, Italijoje atliktas 3 mėnesius trukęs dvigubai aklas, placebo kontroliuojamas, atsitiktinių imčių klinikinis tyrimas, kuriame dalyvavo 81 II tipo CD sergantis pacientas [24]. Malaguarnera M. ir kt. (2009) vykdymo tyrimo metu po 1 g L – karnitino 2 kartus per dieną (k./d.) vartojusių eksperimentinės grupės tiriamųjų kraujo mėginiuose stebėtas statistiškai reikšmingas MTL cholesterolio ir oksiduotų MTL koncentracijos sumažėjimas, lyginant su kontrolinės grupės dalyvių kraujo mėginiais [24].

Aukščiau aprašytos studijos metu L – karnitiną vartojusių pacientų grupėje, be jau paminėtų rodiklių sumažėjimo, taip pat buvo užfiksuotas statistiškai reikšmingas apolipoproteino A1 (Apo A1) bei apolipoproteino B – 100 (Apo B – 100) sumažėjimas, lyginant su placebo grupe [24]. Tuo tarpu Galvano F. ir kt. (2009) palygino dar vieno ŠKS ligų rizikos faktoriaus – iš Apo A1 ir Apo B – 100 sudaryto lipoproteino A (Lp A) – koncentraciją simvastatinu gydomų II tipo CD sergančių pacientų kraujyje su Lp A koncentracija sergančiųjų, kurių simvastatino terapija buvo papildoma L – karnitinu, kraujyje [15]. 4 mėnesius trukusio dvigubai aklo, atsitiktinių imčių klinikinio tyrimo, kuriame dalyvavo 75 pacientai, metu užfiksuotas statistiškai reikšmingas Lp A sumažėjimas 2 g L – karnitino kartu su simvastatinu vartojusiems tiriamiesiems, lyginant su dalyviais, kuriems buvo taikoma simvastatino monoterapija [15]. Toks Lp A koncentracijos sumažėjimas Galvano F. ir kt. (2009) mokslininkų grupės aiškinamas vienos iš Lp A sudedamųjų dalių (Apo B – 100) koncentracijos sumažėjimu [15].

II tipo CD sergantys ligoniai, pacientai, kuriems būdinga sutrikusi gliukozės tolerancija bei senyvo amžiaus gyventojai apskritai dalijasi vienu bendru sveikatos sutrikimu – atsparumu insulinui [27]. Manoma, jog šią būklę sukelia sutrikusi mitochondrijų funkcija, kurią sąlygoja kraujyje cirkuliuojančio ir audinių L – karnitino koncentracijų sumažėjimas [27]. Norėdami patvirtinti tokį atsparumo insulinui patogeninį mechanizmą Molfino A. ir kt. (2010) atliko 10 dienų trukusį atsitiktinių imčių klinikinį tyrimą, į kurį buvo įtraukta 16 senyvo amžiaus dalyvių, kuriems buvo nustatyta priešdiabetinė būklė, arba jau sergančių II tipo CD [27]. Šios klinikinės studijos rezultatai bylojo apie statistiškai reikšmingą insulino koncentracijos kraujo plazmoje nevalgius bei pagal matematinę formulę apskaičiuojamo homeostazės modelio insulino atsparumui vertininti rezultato sumažėjimą

tiriamiesiems, kurių hipokalorinė dieta buvo derinama su 2 g L – karnitino 2 k./d., lyginant su pacientais, kuriems buvo taikomas vien tik kalorijų apribojimas [27].

### **1.3.2. L – karnitino vaidmuo siekiant sumažinti nuovargį**

An H. J. ir kt. (2016) Seule, Pietų Korėjoje atliko 12 savaičių trukmės, dvigubai akla, placebo kontroliuojamą, atsitiktinių imčių klinikinį tyrimą, kuriame dalyvavo 60 pacientų, sergančių pirmine hipotiroze ir gydomų levotiroksinu [8]. Pirminiais L – karnitino efektyvumo rodikliais šio tyrimo metu buvo pasirinkti nuovargio sunkumo skalės (NSS) rezultatai bei Wessely ir Powell skalės, susidedančios iš fizinio ir protinio nuovargio (kiekvieno atskirai) vertinimo, rezultatai [8]. An H. J. ir kt. (2016) atlikta klinikinė studija neparodė statistiškai reikšmingų NSS ar fizinio nuovargio vertinimo rezultatų pokyčių po 660 mg L – karnitino 3 k./d. vartojusiems dalyviams, lyginant su ekvivalentišką dozę placebo vartojusia tiriamųjų grupe [8]. Nepaisant to, L – karnitiną vartojusių pacientų grupėje stebėtas statistiškai reikšmingas protinio nuovargio vertinimo rezultatų sumažėjimas kontrolinės grupės dalyvių atžvilgiu, kurių jaunesnių nei 50 metų pacientų amžiaus grupėje papildė dar ir fizinio nuovargio vertinimo rezultatų sumažėjimas [8].

Kitas klinikinis tyrimas, kurio metu buvo nagrinėjamas L – karnitino vaidmuo nuovargio valdyje, buvo orientuotas į pacientų, kuriems šis nusiskundimas yra bene būdingiausias, grupę – sergančiuosius invaziniu vėžiu [11]. Rytų kooperatinė onkologijos grupė (angl. *Eastern Cooperative Oncology Group*) atliko III fazės, dvigubai akla, placebo kontroliuojamą, atsitiktinių imčių, daugiacentrinį tyrimą, kuris truko 4 savaites ir kuriame dalyvavo 376 pacientai [11]. Šios klinikinės studijos atveju pirminiu L – karnitino veiksmingumo rodikliu pasitelktas testo, vadinamo trumpuoju nuovargio inventoriumi (angl. *Brief Fatigue Inventory (BFI)*) rezultatai, o antrinais – bendro nuovargio, nuotaikos bei skausmo būklių įvertinimo rezultatai [11]. Tyrimo baigtis atskleidė, jog pacientai, vartoję po 1 g L – karnitino 2 k./d., nepatyrė statistiškai reikšmingų *BFI* klausimyno rezultatų ar antrinių L – karnitino efektyvumo vertinimo rodiklių rezultatų skirtumų, lyginant su dalyviais, kuriems buvo duodama placebo [11].

### 1.3.3. L – karnitino poveikis fiziniam našumui

Manoma, jog L – karnitinas gali prisidėti prie spartesnio organizmo atsigavimo po fizinio krūvio sumažindamas po mankštos raumenų audinių patiriamą cheminę žalą ir optimizuodamas jų atkūrimo procesus [20, 23]. Ho J. Y. ir kt. (2010) atliko dvigubai aklą, placebo kontroliuojamą, kryžminio dizaino klinikinį tyrimą, kurio tikslas buvo įvertinti LKLT įtaką tiriamųjų fiziniam našumui bei atsigavimui po fizinio krūvio [20]. Eksperimente dalyvavo 18 sveikų, įprastai aktyvų poilsį besirenkančių, vidutinio amžiaus savanorių, kurių kiekvienas 3 savaites ir 3 dienas gaudavo po 1 g LKLT 2 k./d. arba po ekvivalentišką dozę placebo [20]. Po šio laikotarpio 1 savaitę tiriamiesiems nebuvo duodama nei maisto papildų, nei placebo, o jam pasibaigus kiekvienam LKLT vartojusiam tyrimo dalyviui 3 savaites ir 3 dienas buvo duodama placebo, o kiekvienam, vartojusiam placebo – LKLT [20]. Praėjus kiekvienam 3 savaičių ciklui, kiekvienas tiriamasis turėjo atlikti nustatytą pasipriešinimo pratimų (vyrai – pritūpimų su štanga, o moterys – kojų spaudimo gulint) serijų ir pakartojimų skaičių [20]. Po pasipriešinimo pratimų sekė kraujo mėginių ėmimas tam tikrais laiko intervalais, pradedant 0 – aja minute, įrodęs, jog LKLT statistiškai reikšmingai sumažino biocheminių žymenų, bylojančių apie greitesnį atsigavimą po fizinio krūvio, koncentracijas kraujyje [20]. Svarbu paminėti, jog LKLT poveikis fiziniam našumui, kuris šios klinikinės studijos metu buvo tiriamas funkcinio efektyvumo testais, įrodytas nebuvo [20].

Beveik tuo pačiu metu, Botukatu mieste, Brazilijoje de Faria Coelho C. ir kt. (2010) atliko klinikinį tyrimą, trukmę, imtimi (jos dydžiu ir dalyvių amžiaus intervalu) bei L – karnitino paros doze panašų į Ho J. Y. ir kt. (2010) vykdytą eksperimentą [20, 41]. Placebu kontroliuojamo, atsitiktinių imčių tyrimo tikslu pasirinktas L – karnitino poveikio metabolizmo greičiui poilsio metu (MGPM) ir laisvųjų riebalų rūgščių (LRR) oksidacijai ištyrimas [41]. Šios klinikinės studijos metu 30 dienų buvo renkami duomenys apie 21 antsvorį turintį, tačiau aktyvų vidutinio amžiaus savanorį, registruojant tokių parametrų, kaip kalorijų suvartojimas per parą, kūno masės indeksas, MGPM, maksimalus deguonies suvartojimas ( $VO_{2max}$ ), LRR kiekis kraujyje poilsio metu ir atliekant fizinius pratimus, duomenis [41]. de Faria Coelho C. ir kt. (2010) atlikto klinikinio tyrimo rezultatai neparodė statistiškai reikšmingų išvardytų parametrų pokyčių po 1,8 g L – karnitino per dieną vartojusiems dalyviams, lyginant su kontrolinės grupės dalyviais [41]. Tokie mokslininkų grupės gauti rezultatai leidžia paneigti hipotezę, jog L – karnitinas, modeliuodamas MGPM, gali padidinti tiriamųjų fizinį našumą ar energetinių substratų sunaudojimą, tokiu būdu prisidedamas prie kūno masės mažinimo [41].

### 1.3.4. L – karnitino reikšmė autizmo terapijai

Autizmo spektro sutrikimų (ASS) turinčių pacientų tyrimai atskleidė, jog šiems ligoniams būdingi dėl karnitino nepakankamumo atsiradę energijos apykaitos sutrikimai [17, 35]. Vadovaujantis šiais duomenimis spėjama, jog L – karnitinas gali būti veiksmingas siekiant palengvinti ASS turinčių pacientų patiriamus simptomus [16, 17]. Tokiam L – karnitino poveikiui patvirtinti arba paneigti Geier D. A. ir kt. (2010) atliko perspektyvųjį, dvigubai aklą, atsitiktinių imčių, placebo kontroliuojamą klinikinį tyrimą, į kurį buvo įtraukta 30 vaikų, kenčiančių nuo ASS [17]. Praėjus 3 eksperimento mėnesiams, po 50 mg L – karnitino vienam kilogramui kūno masės per dieną vartojusių tiriamųjų vaikystės autizmo vertinimo skalės (angl. *Childhood Autism Rating Scale (CARS)*) bei bendro klinikinio įspūdžio formos rezultatų pokytis buvo statistiškai reikšmingai didesnis, lyginant su kontrolinės grupės tiriamųjų rezultatų pokyčiu [17]. Taip pat buvo nustatyta statistiškai reikšminga koreliacija tarp laisvojo karnitino koncentracijos pacientų kraujo serume pokyčių ir teigiamų *CARS*, rankų raumenų jėgos matavimo ir pažinimo vertinimo rezultatų pokyčių [17].

### 1.3.5. Antioksidacinis L – karnitino poveikis

Cao Y. ir kt. (2011) Čingdao mieste, Kinijoje L – karnitino antioksidaciniam poveikiui įvertinti atliko tyrimą, kuris savo pobūdžiu šiek tiek skyrėsi nuo aukščiau aprašytų eksperimentų [9]. Dvylikai sveikų savanorių buvo skirta vienkartinė 2 g L – karnitino dozė, po kurios pavartojimo, nustatytais laiko intervalais, buvo imami tyrimo dalyvių kraujo mėginiai [9]. Tuomet buvo nustatomos L – karnitino, superoksido dismutazės, glutationo peroksidazės, katalazės ir bendros antioksidacinės talpos (BAOT) koncentracijos tiriamųjų kraujo plazmoje [9]. Šios studijos metu stebėta teigiama koreliacija tarp L – karnitino ir visų aukščiau paminėtų antioksidacinių fermentų koncentracijų dalyvių kraujo plazmoje [9]. Vadovaudamiesi tokiais tyrimo rezultatais, Cao Y. ir kt. (2011) teigia, jog L – karnitinas gali padidinti sveikų gyventojų antioksidacinių fermentų aktyvumą ir BAOT bei kaip papildas galėtų būti vartojamas pacientų, sergančių lėtinėmis ligomis, nuo kurių neatsiejamas oksidacinis stresas [9].

#### 1.4. Metodai, taikomi L – karnitino kokybinei ir kiekybinei analizei atlikti

L – karnitino kokybiniam ir kiekybiniam vertinimui naudojamus metodus galima suskirstyti į dvi stambias grupes – Europos farmakopėjoje reglamentuojamus metodus bei moksliniuose straipsniuose publikuojamas technikas. Europos farmakopėjoje aprašomas L – karnitino tapatybės nustatymas yra atskirtas nuo kiekybinio tyrimo, tuo tarpu mokslinėse publikacijose pristatomi metodai leidžia atlikti kokybinę ir kiekybinę medžiagos analizę tuo pačiu metu [14].

Europos farmakopėjoje pateikiami pirminiai ir antriniai L – karnitino kokybinio nustatymo metodai [14]. Kai kurių metodų taikymo atvejais prieš atliekant bandymus turi būti pagaminamas tirpalas S, kuris ruošiamas 5,00 g tiriamosios medžiagos ištirpinus vandenyje, savo sudėtyje neturinčiame anglies dioksido, tuomet gautą tirpalą praskiedus iki 50,0 ml [14].

Pirminė L – karnitino identifikacija atliekama pasitelkiant infraraudonųjų spindulių (IR) absorbcijos spektrofotometriją [14]. Viena iš šio metodo sąlygų – mėginio skaidrumas, kuriai įgyvendinti paruošiamos plokštelės iš vakuume 50 °C temperatūroje 5 valandas džiovintos medžiagos [14]. Optinio sukimo testas Europos farmakopėjoje priskiriamas tiek prie pirminių, tiek prie antrinių L – karnitino atpažinimo metodų, o su tirpalu S atliekamo testo rezultatai, esant 25 °C temperatūrai, turi būti stebimi intervale nuo – 29,0 iki – 32,0 bevandenės medžiagos atveju [14].

Antriniam L – karnitino nustatymui naudojama spalvinė reakcija, atliekama su 10 ml praskiestos sieros rūgšties ir 30 ml amonio reinekato tirpalo, 1 ml tirpalo S prieš tai praskiedus 9 ml vandens [14]. Stebimos rožinės spalvos nuosėdos, kurios, praėjus pusvalandžiui po jų susidarymo, filtruojamos ir plaunamos vandeniui, etanoliu, paskiausiai – acetonu. Reglamentuojamos išdžiovintų nuosėdų lydymosi temperatūros ribos: 147 °C – 150 °C [14].

Europos farmakopėjoje reglamentuojamas kiekybinio L – karnitino tyrimo metodas – titravimas 0,1 M perchlorato rūgštimi, 0,125 g tiriamosios medžiagos ištirpinus mišinyje, sudarytame iš 3 dalių bevandenės skruzdžių rūgšties ir 50 dalių bevandenės acto rūgšties, reakcijos pabaigą nustatant potenciometru [14].

Darbo autorės manymu, aptariant per pastaruosius dešimt metų publikuotus L – karnitino kokybinės ir kiekybinės analizės metodus, nuo maisto papildų tyrimų yra neatsiejami ir šios medžiagos tyrimai vaistuose. Iš nagrinėjamoje literatūroje pateiktos informacijos matyti, jog, analitiniu požiūriu, maisto papildą nuo vaistinio preparato skiria tik L – karnitino kiekis, tuo tarpu tiek maisto papildų, tiek vaistų mėginio paruošimas ir tyrimas fiziko – cheminės analizės metodais yra vienodas [7].

Moksliniuose straipsniuose L – karnitino kokybiniam ir kiekybiniam nustatymui farmacinių produktų bandiniuose dažniausiai siūlomi chromatografiniai tyrimo metodai, iš kurių populiariausia – efektyvioji skysčių chromatografija [7, 30, 34, 39]. Taip pat L – karnitino atpažinimas ir kiekybinis įvertinimas gali būti sėkmingai atliekami pasitelkiant dujų chromatografiją bei efektyviają plonasluoksnę chromatografiją (EPC) [6, 12]. Nepaisant chromatografiniams tyrimams validuotų metodikų gausos, pranešama ir apie elektroforetinių metodų pritaikymą L – karnitino kokybinei ir kiekybinei analizei [29, 31, 32]. Naujausiose publikacijose pristatomi pažangūs kombinuoti metodai, kuriems realizuoti pasitelkiama molekulinė fluorescencija ir nanotechnologijos, papildo L – karnitino tyrimams naudojamų technikų įvairovę bei įrodo nuolatinį šios medžiagos kokybinio ir kiekybinio nustatymo metodus orientuoto mokslo tobulėjimą [13, 21].

Atliekant L – karnitino kokybinę ir kiekybinę analizę, ESC gali būti jungiama su įvairiais detektoriais, pavyzdžiui – UV, diodų matricos detektoriais [30, 39]. Taip pat šis metodas gali būti derinamas su tiesiogine žiedinio dichrozmo (ŽD) detekcija bei su linijinės jonų gaudyklės masių spektrofotometrija (ESC – LJM MS) [7, 34]. Vienas iš plataus detektorių pasirinkimo privalumų – galimybė vieno tyrimo metu atlikti ne tik LKLT, bet ir kitų farmaciniame produkte esančių medžiagų kokybinį ir kiekybinį nustatymą [7, 30, 34, 39].

ESC metodu kartu su L – karnitinu dažniausiai yra nustatomos aktyviojo komponento priemaišos, tačiau, atliekant bandymus su vaistais, kartu gali būti identifikuojamos ir kiekybiškai įvertinamos ir kitos veikliosios medžiagos, viena jų – lizino hidrochloridas [30, 39]. Atvirkštinių fazių ESC su UV detektoriumi gali būti taikoma pagrindinės priemaišos ir degradacijos produkto – krotonoilbetaino – kiekybinei ir kokybinei analizei ir yra validuotas metodas tablečių, savo sudėtyje turinčių L – karnitino, stabilumo tyrimams atlikti [39].

Pasitelkus ESC su tiesiogine ŽD detekcija, pagrįstą skirtinga kairiojo ir dešiniojo karnitino enantiomerų poliarizuotos šviesos absorbcija, tuo pačiu metu gali būti atliekama ne tik L – karnitino analizė, bet ir įvertinamas maisto papildų enantiomerinis grynumas [7]. L – karnitino atskyrimą nuo D – karnitino įgalina būtent ŽD spektras, kuris de Andrés F. ir kt. (2010) buvo palygintas su UV spektru [7]. Mokslininkų grupės pastebėtas skirtumas – UV spektras abiem karnitino enantiomerams yra vienodas, tuo tarpu ŽD spektre stebimos tokį patį signalo intensyvumą vaizduojančios kreivės, turinčios skirtingus ženklus ordinačių ašies atžvilgiu ir išsidėsčiusios viena prieš kitą [7].

Norint atlikti sėkmingą L – karnitino (o daugeliu atveju ir vienos ar kelių tam tikrų priemaišų) nustatymą, chromatografinės kolonėlės parinkimas yra ne mažiau svarbus, nei detektoriaus pritaikymas. Dažniausiai naudojamos C<sub>8</sub> ir C<sub>18</sub> (normaliųjų arba atvirkštinių fazių) ESC kolonėlės, tačiau Wang H. ir Xie S. (2017) inovatyviam maisto papildų, savo sudėtyje turinčių L – karnitino,

vertinimui pritaikė ir Q1 kolonėlę [7, 30, 34, 39]. Herbicidų tyrimams sukurta kolonėlė šių mokslininkų buvo sėkmingai panaudota antrajai chromatografijos dimensijai realizuoti atliekant dviejų dimensijų ESC – LJM MS, kuomet pirmajai dimensijai pasitelkta C<sub>8</sub> chromatografinė kolonėlė [34]. Dviejų dimensijų ESC – LJM MS ne tik leidžia atskirti keturias L – karnitino priemaišas (du reagentus, viena tarpinį produktą ir vieną dehidrogenacijos produktą), bet ir yra įvardijama selektyvesne už įprastą ESC [34]. Pasak Wang H. ir Xie S. (2017), didesnis selektyvumas pasiekiamas skirtingu išskirstymo režimų taikymo dėka, kuri sąlygoja dvi to paties eksperimento metu keičiamos kolonėlės [34].

Albrecht A. ir kt. (2014) mokslininkų komanda polemizuoja su de Andrés F. ir kt. (2010) panaudotu tyrimo metodu, teigdami, jog minimas metodas, norint atlikti įprastinį ištyrimą, yra nepraktiškas dėl varginančios analizės ir brangumo [6, 7]. Savo ruožtu Albrecht A. ir kt. (2014) L – karnitino kokybiniam ir kiekybiniam tyrimui maisto papilduose bei jų enantiomerinio grynumo įvertinimui pasiūlė chiralinę dujų chromatografiją su liepsnos jonizacijos detektoriumi (DC – LJM) [6]. Kita vertus, DC – LJM reikalauja derivatizacijos procedūros, kuomet vykdoma nelakaus karnitino konversija į lakų β – acetoksi – γ – butirolaktoną [6]. Derivatizacijos žingsnis yra neišvengiamas taikant ir Dąbrowska M. ir kt. (2012) pristatytą efektyviają plonasluoksnę chromatografiją su UV densitometrine detekcija [12]. Taigi, aukščiau aprašomi chromatografiniai metodai, nors ir yra siejami su tyrimo kainos ir analizei skirto laiko sąnaudų sumažinimu, stokoja pranašumų prieš derivatizacijos nereikalaujančią ESC [6, 12].

L – karnitinui būdingas teigiamas krūvis kapiliarinę elektroforezę (KE) paverčia dar vienu patraukliu šio junginio kokybinės ir kiekybinės analizės metodu [29, 31, 32]. Sánchez – Hernández L. ir kt. (2010) maisto papildų, savo sudėtyje turinčių L – karnitino, identifikacijai ir kiekybiniam nustatymui pasiūlė kapiliarinės elektroforezės – tandeminės masių spektrometrijos (KE – MS/MS) metodą [31]. Vėliau šiek tiek modifikuotas šis metodas buvo pritaikytas ir vaistinių preparatų, kurių veiklioji medžiaga yra L – karnitinas, kiekybiniam ir kokybiniam tyrimams [32]. Dėl kapiliarinei elektroforezei būdingos didelės skiriamosios gebos ir išskirstymo greičio bei masių spektrometrijos pagalba gaunamos informacijos apie junginio struktūrą KE sujungta su MS yra daug žadanti technika norint ne tik atlikti L – karnitino analizę, bet ir nustatyti farmacinių produktų enantiomerinį grynumą [31, 32].

Nepaisant tokio pranašumo, kaip enantioselektyvumas, KE – MS/MS pasižymi imlumu laikui, nes šio metodo pritaikymui praktikoje būtina derivatizacijos procedūra, atliekama su acetone paruoštu 9 – fluorenilmetoksikarbonilo tirpalu [31, 32]. KE – MS/MS alternatyvus elektroforetinis metodas galėtų būti Pormsila W. ir kt. (2010) aprašyta kapiliarinė elektroforezė su bekontakto laidumo detekcija [29]. Priešingai nei taikant KE – MS/MS, kapiliarinės elektroforezės su laidumo detekcija

atveju derivatizacijos žingsnis nereikalingas, tačiau pastaruoju metodu neįmanoma atskirti dviejų karnitino enantiomerų vieno nuo kito [29, 31, 32].

Atliekant naujausios literatūros analizę nesunku pastebėti, jog greitėjantis gyvenimo tempas ir populiarėjančios aplinkosaugos idėjos verčia tyrėjus ieškoti ne tik paprastų ir greitų, bet ir aplinkai nekenksmingų L – karnitino kokybinės ir kiekybinės analizės metodų. Vienas tokių – Isaguirre A. C. ir kt. (2016) pristatytas molekulinės fluorescencijos metodas, kurį taikant fluorescenciniams matavimams atlikti naudojamas spektrofluorimetras su ksenono dujų lempa ir fotodaugintuvu [21]. L – karnitinui fluorescencinė emisija nebūdinga, todėl neišvengiama derivatizacijos procedūra su fluorescuojančia medžiaga – 9 – fluorenilmetil chloroformiatu (FEMCF) [21]. Ši technika sujungia L – karnitino ekstrakcijos natrio taurodeoksicholatu, derivatizacijos reakcijos su FEMCF ir molekulinės fluorescencijos analitines galimybes į bendrą visumą [21].

Sunku surasti analogų Dehdari Vais R. ir kt. (2018) pasiūlytam inovatyviam metodui, puikiai iliustruojančiam nanotechnologijų pritaikymą L – karnitino kokybiniam ir kiekybiniam nustatymui [13]. Šios mokslininkų grupės tyrimas atliekamas pasitelkiant trijų elektrodų kamerą, kuomet darbinio elektrodo pasirenkamas anoduotas nikelio ir vario lydinys, o L – karnitinas įvertinamas amperometriškai [13]. Aptariamam metodui ne tik būdingi greitumas ir paprastumas, bet ir, priešingai nei DC, EPC, KE – MS/MS atvejais, nereikalinga jokia apdorojimo procedūra, o tai priartina jį prie tokių pranašių L – karnitino analizės metodų, kaip ESC ar KE su bekontakto laidumo detekcija [13].

## 2. TYRIMO METODIKA

### 2.1. Tyrimo objektas

Šio eksperimentinio tyrimo objektas – tai penki skirtingi Lietuvos Respublikoje notifikuoti maisto papildai, savo sudėtyje turintys L – karnitino.

#### 2.1.1. Maisto papildų atranka

Visų pirma buvo atliktas Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos (VMVT) internetiniame tinklalapyje pateikiamo LR notifikuočių maisto papildų sąrašo dalies tyrimas [4]. Analizei pasirinkti tik nuo 2014 m. sausio 1 d. VMVT pateikti maisto papildų notifikacijos prašymai, kurių nagrinėjimas prieš eksperimentinio tyrimo pradžią jau buvo baigtas. Į paieškos laukelį „Gaminys ar NR“ įvedus raktinį žodį „karnitinas“, aptikti 2 baigti nagrinėti notifikacijos prašymai, o įvedus „*carni*“ – 53. Tuomet iš 55 paieškos rezultatų buvo atmesti visi maisto papildai, į kurių pavadinimą įėjo vienas iš naudotų raktinių žodžių, tačiau jų aktyvusis komponentas buvo ne L – karnitinas, o koks nors kitas junginys, pavyzdžiui, acetil L – karnitinas. Galiausiai pasirinkti penki skirtingų gamintojų maisto papildai, kuriems taikytas atrankos kriterijus – į jų sudėtį turėjo įeiti tik vienas aktyvusis komponentas – L – karnitinas. Šio junginio kokybinei ir kiekybinei analizei atlikti nuspręsta pasirinkti vienos farmacinės formos maisto papildus – kapsules, mat jų asortimentas LR gausiausias, be to, į jų sudėtį kur kas rečiau įeina papildomi aktyvieji komponentai, lyginant su, pavyzdžiui, LR notifikuotais geriamaisiais tirpalais.

Dveji iš penkių eksperimentui pasirinktų maisto papildų buvo įsigyti skirtingose jais prekiaujančio vaistinių tinklo vaistinėse Lietuvoje. Iš likusių trijų maisto papildų du buvo pirkti į sportininkus orientuotose maisto papildų, sportinės aprangos ir aksesuarų parduotuvėse Lietuvoje, o vienas – užsakytas internetinėje sportininkams skirtoje parduotuvėje. Trijų tyrimui pasirinktų maisto papildų kilmės šalis yra Vokietija, vieno – Lenkija, o dar vienas į Lietuvą buvo įvežtas iš JAV. Šiame darbe analizuotų maisto papildų pavadinimai bus šifruojami raide K (nuo žodžio „kapsulė“) ir atsitiktine tvarka kiekvienam papildui priskirtu numeriu.

### 2.1.2. Tyrimui pasirinktų maisto papildų sudėtis

Pateikiama ant analizuotų kapsulių pakuočių nurodyta jų kokybinė sudėtis:

- **Kapsulių nr. 1 (K#1)** sudėtis: **L – karnitino L – tartratas**, kapsulė – želatina, stabilizatorius riebalų rūgščių magnio druskos, lipnumą reguliuojanti medžiaga silicio dioksidas.
- **Kapsulių nr. 2 (K#2)** sudėtis: **L – karnitino L – tartratas**, kapsulė – želatina, rūgštingumą reguliuojančios medžiagos citrinų rūgštis ir vyno rūgštis, stabilizatorius riebalų rūgščių magnio druskos, lipnumą reguliuojanti medžiaga silicio dioksidas.
- **Kapsulių nr. 3 (K#3)** sudėtis: **L – karnitino L – tartratas**, kapsulė – želatina, dažiklis E171, lipnumą reguliuojanti medžiaga mikrokristalinė celiuliozė, magnio stearatas.
- **Kapsulių nr. 4 (K#4)** sudėtis: **L – karnitinas**, kapsulė – želatina, užpildas kukurūzų krakmolą, rūgštingumą reguliuojanti medžiaga vyno rūgštis, lipnumą reguliuojanti medžiaga silicio dioksidas, lipnumą reguliuojanti medžiaga riebalų rūgščių kalcio druskos.
- **Kapsulių nr. 5 (K#5)** sudėtis: **L – karnitino L – tartratas**, kapsulė – želatina, magnio stearatas.

## 2.2. Tyrimo metodai

Efektyvioji skysčių chromatografija šio eksperimento metu buvo pasirinkta kaip pagrindinis maisto papildų, savo sudėtyje turinčių L – karnitino, kokybinės ir kiekybinės analizės metodas. Dujų chromatografija buvo pasitelkta kaip papildomas L – karnitino maisto papildų cheminės sudėties tyrimo metodas. DC pagrindinė paskirtis eksperimento metu buvo papildyti ESC metodą ir suteikti galimybę palyginti L – karnitino maisto papildų kiekybinės analizės rezultatus, gautus naudojant du skirtingus metodus.

## 2.3. Priemonės ir prietaisai

L – karnitino kokybinei ir kiekybinei analizei atlikti abiejų pasirinktų metodų atvejais buvo naudojamos šios priemonės ir prietaisai: analitinės svarstyklės Libra UniBloc AUW120D (Shimadzu, Japonija); vandens valymo sistema Millipore (Millipore Mili – Q, Millipore, JAV); termostatinė

ultragarso vonelė WiseClean WUC – A06H (Witeg Labortechnik GmbH, Vokietija); Q – Max membraniniai filtrai (Frisenette, Vokietija); Automatinės pipetės (WINLAB, Vokietija).

## **2.4. Efektyvioji skysčių chromatografija**

Efektyviosios skysčių chromatografijos metodas L – karnitino maisto papildų cheminės sudėties tyrimui buvo kuriamas eksperimentiniu būdu, atsižvelgiant į moksliniuose straipsniuose publikuojamas metodikas, tačiau tai nėra absoliutus kurios nors metodikos atkartojimas [7, 30, 34, 39]. Literatūroje siūlomos chromatografavimo sąlygos buvo bandomos pritaikius jas Analizinės ir toksikologinės chemijos katedros laboratorijoje esančiai aparatūrai bei medžiagoms [7, 30, 34, 39]. Tirpiklis standartinio tirpalo paruošimui ir L – karnitino ekstrakcijai iš maisto papildų nustatytas vadovaujantis Europos farmakopėjoje pateikiama informacija apie šio junginio tirpumą [14].

### **2.4.1. Aparatūra**

Shimadzu Nexera X2 chromatografinė sistema, sudaryta iš keturių kanalų siurblio LC – 30AD, tirpiklio degazatoriaus, automatinio mėginių įvedimo įrenginio SIL – 30AC, termostato CTO – 20AC ir diodų matricos detektoriaus SPD – M20A (Shimadzu, Japonija).

### **2.4.2. Medžiagos**

Kapsulės, savo sudėtyje turinčios nuo 300 iki 1000 mg L – karnitino arba LKLT (pateikiami ant maisto papildų pakuočių nurodyti aktyviojo komponento kiekiai); standartizuoti kristaliniai L – karnitino milteliai (Sigma – Aldrich, Vokietija); dinatrio vandenilio fosfatas (Sigma – Aldrich, Vokietija); 85 % fosforo rūgštis ( $\geq 99,99$  %, Sigma – Aldrich, Vokietija); 0,1 % trifluoracto rūgštis (Sigma – Aldrich, Vokietija); metanolis ( $\geq 99,9$  %, Sigma Aldrich, Vokietija); acetonitrilas ( $\geq 99,8$  %, Sigma – Aldrich, Vokietija); išgrynintas vanduo, išvalytas vandens valymo sistema (Millipore Milli – Q, Millipore, JAV).

### **2.4.3. Chromatografavimo salygos**

Kolonėlė – Hydrosphere C<sub>18</sub>, kurios ilgis – 250 mm, vidinis diametras – 4,0 mm, sorbento dalelių dydis – 5 μm. Judančioji fazė – 70 mM dinatrio vandenilio fosfato tirpalas, kurio pH = 2,1 (pH reguliuojamas naudojant fosforo rūgštį). Eliuento tekėjimo greitis – 1,0 ml/min. Eliuavimo būdas – izokratinis. Standarto tirpalo ir mėginio injekcijos tūris – 10 μl. Šviesos bangos ilgis – 205 nm. Kolonėlėje palaikoma temperatūra – 30 °C. Vieno mėginio analizės trukmė – 5 minutės.

### **2.4.4. Standartinio tirpalo paruošimas**

Analitinėmis svarstyklėmis pasveriami 5 mg standartizuotų kristalinių L – karnitino miltelių, kurie perkeliama į 10 ml tūrio matavimo kolbą ir ištirpinami nedideliame išgryninto vandens kiekyje. Tuomet pripilama išgryninto vandens iki ribos. Gautas 500 μg/ml koncentracijos standartinis L – karnitino tirpalas injekuojamas į ESC sistemą.

### **2.4.5. Kapsulių mėginių paruošimas**

Kiekvieno maisto papildo mėginių paruošimui naudojama po vieną kapsulę. Kiekviena kapsulė atidaroma, jos turinys išberiamas, pasveriamas analitinėmis svarstyklėmis ir perkeliama į 20 ml tūrio matavimo kolbą, tuomet pripilama vandens iki ribos. Mišinys, esant kambario temperatūrai, veikiamas ultragarsu 30 minučių arba iki visiško kietųjų dalelių suirimo. Gautas tirpalas filtruojamas per membraninį 0,45 μm skersmens PVDF filtrą ir injekuojamas į ESC sistemą.

## **2.5. Dujų chromatografija**

Dujų chromatografijos metodas L – karnitino maisto papildų kokybinei ir kiekybinei analizei atlikti buvo sukurtas eksperimentiniu būdu, vadovaujantis, bet neapsiribojant Albreht A. ir kt. (2014) aprašyta metodika [6]. Chromatografavimo sąlygos buvo modifikuojamos atsižvelgiant į katedros,

kurioje buvo atliekamas magistrinis baigiamasis darbas, laboratorijoje esančią aparatūrą, turimas medžiagas [6]. Tirpiklis standartinio tirpalo ir maisto papildų mėginių paruošimui pasirinktas pagal Europos farmakopėjoje nurodomą L – karnitino tirpumą [14]. Atsižvelgiant į faktą, jog L – karnitinas yra dviejų aminorūgščių darinys, derivatizacijos žingsnis buvo atliekamas vadovaujantis Stenerson K. K. (2011) pasiūlyta procedūra bei Gaivenio M. (2018) magistro baigiamajame darbe aprašyta aminorūgščių derivatizacija [1, 41].

### 2.5.1. Aparatūra

Chromatografinė sistema, sudaryta iš dujų chromatografo „Shimadzu GCMS – QP2010 Ultra system“ (Shimadzu Corporation) ir masių spektrometrijos detektoriaus.

### 2.5.2. Medžiagos

Kapsulės, savo sudėtyje turinčios nuo 300 iki 1000 mg L – karnitino arba LKLT (pateikiami ant maisto papildų pakuočių nurodyti aktyviojo komponento kiekiai); standartizuoti kristaliniai L – karnitino milteliai (Sigma – Aldrich, Vokietija); acetonitrilas ( $\geq 99,8$  %, Sigma – Aldrich, Vokietija); derivatizacijos reagentas N – metil – N – (tert – butildimetilsilil)trifluoroacetamidas (MTBSTFA) ( $> 97$  %, Sigma – Aldrich, Vokietija); azotas (Sigma – Aldrich, Vokietija); helis ( $\geq 99,999$  %, AGA GAS, Lietuva); išgrynintas vanduo, išvalytas vandens valymo sistema (Millipore Milli – Q, Millipore, JAV).

### 2.5.3. Chromatografavimo sąlygos

Kolonėlė – Rt –  $\beta$ DEXsa (Restek Corporation, JAV), kurios ilgis – 30 m, vidinis diametras – 0,25 mm, sorbento dalelių dydis – 0,25  $\mu$ m. Nešančios dujos – helis. Tekėjimo kolonėle greitis – 1,3 ml/min., bendras tekėjimo greitis – 134,6 ml/min. Injekcijos tūris – 1  $\mu$ l. Susidariusios dujos pertraukiamai (angl. *Split*) perduodamos į kolonėlę, toliau dujų nešiklių srautą dalijant santykiu 1:100. Slėgis – 76,7 kPa. Injektoriaus temperatūra – 230 °C, jonų šaltinio temperatūra – 200 °C, DC – MS

jungties temperatūra – 230 °C. Registruojamas bendras jonų signalas ir masių spektrai nuskaitomi nuo 29 iki 500 m/z. Naudotas gradientinis temperatūros kitimas, vaizduojamas 1 lentelėje.

**1 lentelė. Gradientinis temperatūros kitimas**

Temperatūros kėlimo greitis, °C/min.	Temperatūra, °C	Sulaikymo laikas, min.
-	50,0	0,00
5,00	180,0	0,00
10,00	210,0	5,00

#### **2.5.4. Standartinio tirpalo paruošimas**

Analitinėmis svarstyklėmis pasveriami 10 mg standartizuotų kristalinių L – karnitino miltelių, kurie perkeliama į 10 ml tūrio matavimo kolbą ir ištirpinami nedideliame išgryninto vandens kiekyje. Tuomet pripilama išgryninto vandens iki ribos. Gaunamas 1 mg/ml koncentracijos standartinis L – karnitino tirpalas.

##### **2.5.4.1. Standartinio tirpalo derivatizacijos procedūra**

Automatine pipete paimama 100 µl paruošto L – karnitino standartinio tirpalo ir džiovinama po azoto dujų srove iki sauso likučio (apie 20 minučių). Tuomet pridedama 100 µl acetonitrilo ir 100 µl derivatizuojančio reagento MTBSTFA. Gautas tirpalas kaitinamas 100 °C temperatūros glicerolio vonioje 2,5 valandos ir injekuojamas į DC sistemą.

### **2.5.5. Kapsulių mėginių paruošimas**

Kiekvieno maisto papildų mėginių paruošimui naudojama po vieną kapsulę. Kiekviena kapsulė atidaroma, jos turinys išberiamas, pasveriamas analitinėmis svarstyklėmis ir perkeliamas į 20 ml tūrio matavimo kolbą, tuomet pripilama vandens iki ribos. Mišinys, esant kambario temperatūrai, veikiamas ultragarsu 30 minučių arba iki visiško kietųjų dalelių suirimo. Gautas tirpalas filtruojamas per membraninį 0,45 µm skersmens PVDF filtrą.

#### **2.5.5.1. Kapsulių mėginių derivatizacijos procedūra**

Automatine pipete paimama po 100 µl kiekvieno paruošto L – karnitino kapsulių mėginio ir džiovinama po azoto dujų srove iki sauso likučio (apie 20 minučių). Tuomet į kiekvieną mėginį pridedama po 100 µl acetonitrilo ir po 100 µl derivatizuojančio reagento MTBSTFA. Gauti tirpalai kaitinami 100 °C temperatūros glicerolio vonioje 2,5 valandos ir injekuojami į DC sistemą.

## **2.6. Metodų validacija**

Sukurtos efektyviosios skysčių chromatografijos metodikos tinkamumo patvirtinimui buvo nustatomi tokie ICH gairėse reglamentuojami validacijos parametrai, kaip specifiškumas, glaudumas, susidedantis iš pakartojamumo ir tarpinio preciziškumo, tiesiškumas bei aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribos [38]. Dujų chromatografijos, kaip papildomos L – karnitino maisto papildų cheminės sudėties tyrimo metodikos, validacijai įvertintas metodo specifiškumas ir glaudumas [38].

### **2.6.1. Specifiškumas**

L – karnitino kokybinei ir kiekybinei analizei taikant efektyviają skysčių chromatografiją, metodo specifiškumas buvo vertinamas lyginant standartinio tirpalo ir pasirinkto maisto papildų mėginio chromatogramas. Abejose chromatogramose aiškiai pažymimi L – karnitino sulaikymo laikai

bei junginį identifikuoti leidžiančios smailės. Atliekant dujų chromatografijos metodo specifiškumo įvertinimą, papildomai dar buvo palyginti L – karnitino standartinio tirpalo ir pasirinkto kapsulių mėginio masių spektrai.

### **2.6.2. Glaudumas**

Atliekant L – karnitino kokybinį ir kiekybinį tyrimą ESC ir DC metodais, rezultatų pakartojamumas buvo nustatomas tą pačią dieną ir tomis pačiomis eksperimentinėmis sąlygomis injekuojant mėginį 6 kartus. Siekiant įvertinti tarpinį preciziškumą, abiejų metodų taikymo atvejais mėginys buvo injekuojamas po 6 kartus dvi dienas iš eilės, taikant tokias pačias eksperimentines sąlygas.

### **2.6.3. Tiesiškumas**

ESC metodo tiesiškumo nustatymui buvo brėžiamas grafikas, iliustruojantis smailės ploto priklausomybę nuo standartinio tirpalo koncentracijos. Siekiant atidėti septynis taškus kalibracinei kreivei nubrėžti, buvo gaminami šių koncentracijų standartiniai L – karnitino tirpalai: 500 µg/ml; 250 µg/ml; 125 µg/ml; 62,50 µg/ml; 31,25 µg/ml; 15,63 µg/ml; 7,81 µg/ml. Metodo tiesiškumui patvirtinti pateikiama kalibracinės kreivės lygtis ir apskaičiuotas koreliacijos koeficientas  $R^2$ .

### **2.6.4. Aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribos**

Norint pilnai patvirtinti sukurtą ESC metodiką, buvo nustatomos aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribos. Analitinės procedūros aptikimo riba ICH gairėse apibrėžiama kaip mažiausias analizuojamos medžiagos kiekis bandinyje, kuris gali būti aptinkamas, bet nebūtinai tiksliai įvertinamas kiekybiškai [38]. Tuo tarpu kiekybinio nustatymo riba – tai mažiausias analitės kiekis tiriamame mėginyje, kuris gali būti nustatomas kiekybiškai [38].

## **2.7. Duomenų analizės metodai**

Aritmetiniai trijų L – karnitino kiekio matavimų mėginiuose vidurkiai, standartinis nuokrypis ir santykinė paklaida buvo apskaičiuojami naudojantis Microsoft Office elektronine skaičiuokle Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, JAV).

### **3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS**

#### **3.1. L – karnitino kokybinė ir kiekybinė analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu**

##### **3.1.1. Chromatografavimo sąlygų parinkimas**

Siekiant pritaikyti tinkamiausias chromatografines sąlygas L – karnitino kokybinei ir kiekybinei analizei atlikti, buvo išmėgintos skirtingos kolonėlės ir skirtingi eliuantai. Renkantis optimaliausią kolonėlę, buvo išbandyta po vieną C<sub>8</sub> ir C<sub>18</sub> kolonėlę – atitinkamai ACE C<sub>8</sub>, kurios ilgis – 250 mm, vidinis diametras – 4,6 mm, sorbento dalelių dydis – 5 μm ir Hydrosphere C<sub>18</sub>, kurios ilgis – 250 mm, vidinis diametras – 4,0 mm, sorbento dalelių dydis – 5 μm. Eksperimentų metu išmėginti tokie eliuantai, kaip 0,1 % trifluoracto rūgštis, metanolis, acetontrilas, išgrynintas vanduo, dinatrio vandenilio fosfatas, kurio pH buvo reguliuojamas naudojant 85 % fosforo rūgštį. Galiausiai L – karnitino kokybiniam ir kiekybiniam nustatymui buvo pasirinkta kolonėlė Hydrosphere C<sub>18</sub> ir judančioji fazė dinatrio vandenilio fosfatas, kurio pH = 2,1.

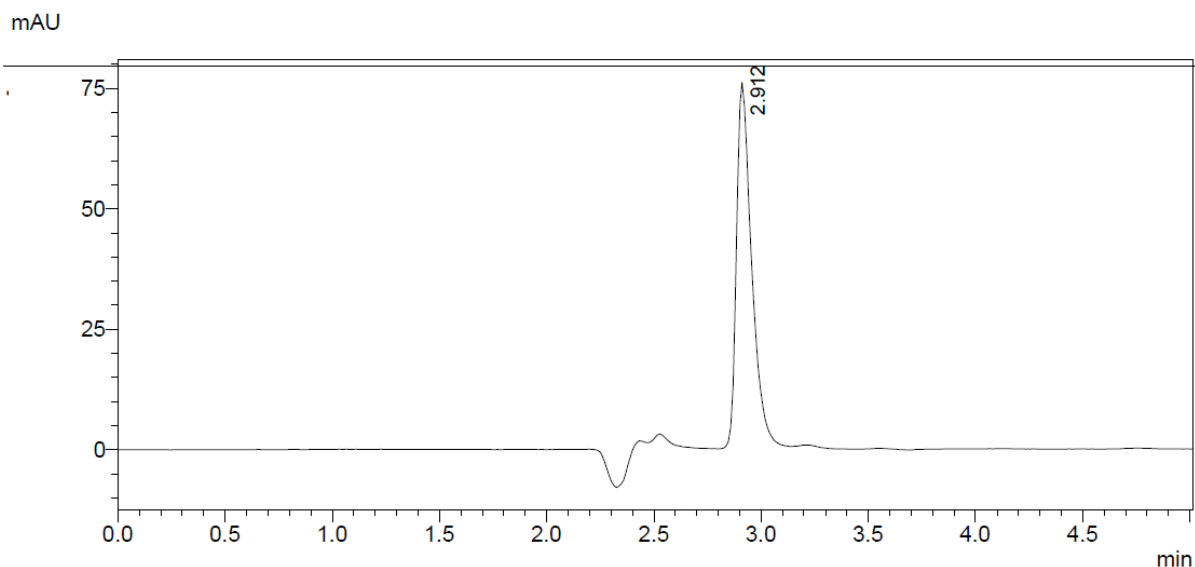
Mokslinėse publikacijose pateikiamos šviesos bangos ilgio skaitinės reikšmės L – karnitinui aptikti šiek tiek skiriasi viena nuo kitos ir įvairuoja nuo 214 nm iki 232 nm [7, 18, 30, 34, 39]. Šio eksperimentinio tyrimo metu L – karnitinas aptiktas esant šiek tiek mažesnei šviesos bangos ilgio skaitinei reikšmei – 205 nm.

Vadovaujantis Europos farmakopėjoje nurodoma informacija, jog L – karnitinas gerai tirpsta vandenyje, visais bandymų atvejais L – karnitino standartinio tirpalo (o vėliau ir maisto papildų mėginių) paruošimui naudotas tirpiklis buvo išgrynintas vanduo [14].

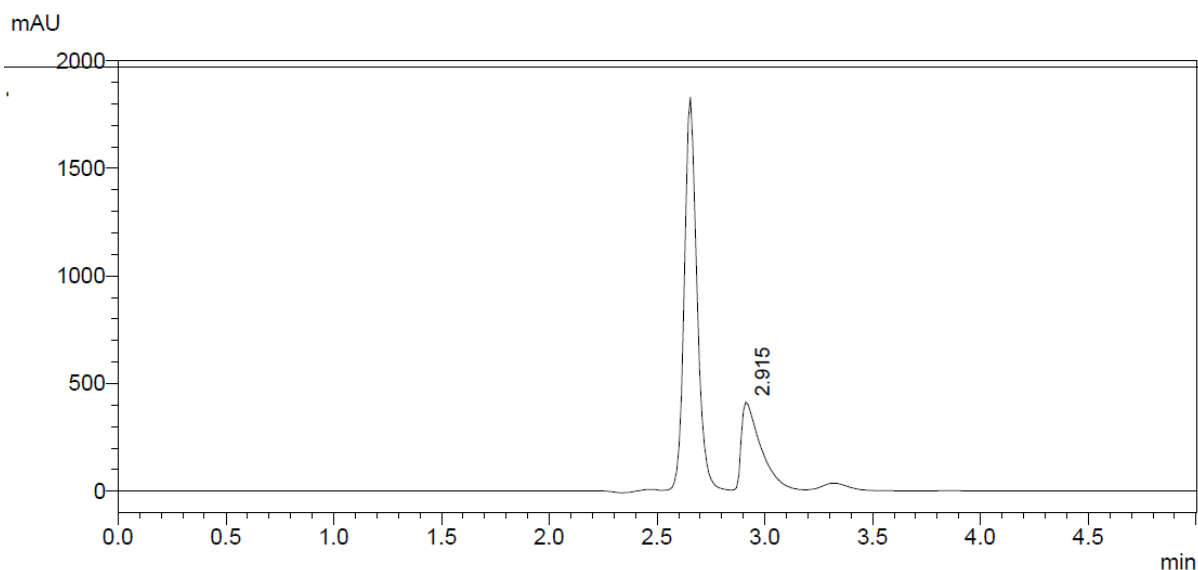
##### **3.1.2. Efektyviosios skysčių chromatografijos metodikos validacija**

###### **3.1.2.1. Efektyviosios skysčių chromatografijos specifiškumas**

Efektyviosios skysčių chromatografijos metodikos specifiškumas buvo nustatytas palyginus L – karnitino standartinio tirpalo (5 pav.) ir pasirinkto maisto papildu K#4 mėginio (6 pav.) chromatogramas.



**5 pav. L – karnitino standartinio tirpalo chromatograma**



**6 pav. Maisto papildu K#4 mėginio chromatograma**

Abejose chromatogramose virš L – karnitiną identifikuoti leidžiančios smailės pažymėti L – karnitino sulaikymo laikai. Kapsulių K#5 mėginio chromatogramoje (6 pav.) be L – karnitino smailės stebima dar viena labai ryški neidentifikuotos medžiagos smailė, kuri bus plačiau aptariama skirsnyje *L – karnitino maisto papildų kokybinės sudėties analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu*. Iš 5 pav. ir 6 pav. vaizduojamų chromatogramų matyti, jog skirtumas tarp L – karnitino sulaikymo laiko, stebėto tiriant maisto papildu K#5 mėginį, ir tarp sulaikymo laiko, užfiksuoto analizuojant standartinio tirpalo mėginį – tik 0,003 min. Vadovaujantis šiais duomenimis galima teigti, jog sukurta ESC metodika yra specifiška L – karnitino nustatymui.

### 3.1.2.2. Efektyviosios skysčių chromatografijos glaudumas

Siekiant įvertinti efektyviosios skysčių chromatografijos metodikos pakartojamumą, per tą pačią dieną L – karnitino standartinio tirpalo mėginys buvo tiriamas 6 kartus, taikant tas pačias eksperimentines sąlygas. ESC metodikos tarpiniam preciziškumui įrodyti tiriamosios medžiagos standartinio tirpalo bandinys buvo injekuojamas dvi dienas iš eilės po 6 kartus, taip pat nekeičiant tyrimo sąlygų. Tuomet abiem atvejais buvo apskaičiuojamas santykinis standartinis nuokrypis (SSN) sulaikymo laikui ir smailės plotui, gautus rezultatus pateikiant 2 lentelėje.

*2 lentelė. Efektyviosios skysčių chromatografijos metodikos glaudumo nustatymo rezultatai*

	<b>Pakartojamumas</b>	<b>Tarpinis preciziškumas</b>
<b>SSN sulaikymo laikui, %</b>	0,153	0,104
<b>SSN smailės plotui, %</b>	0,066	0,551

Nei stebėti ESC metodikos pakartojamumo, nei tarpinio preciziškumo rezultatai neviršijo reglamentuojamų ribų (atitinkamai – ne didesnis, nei 5 % SSN pakartojamumui ir ne didesnis, nei 10 % SSN tarpiniam preciziškumui), todėl galima tvirtinti, jog sukurtai ESC metodikai yra būdingas glaudumas [38].

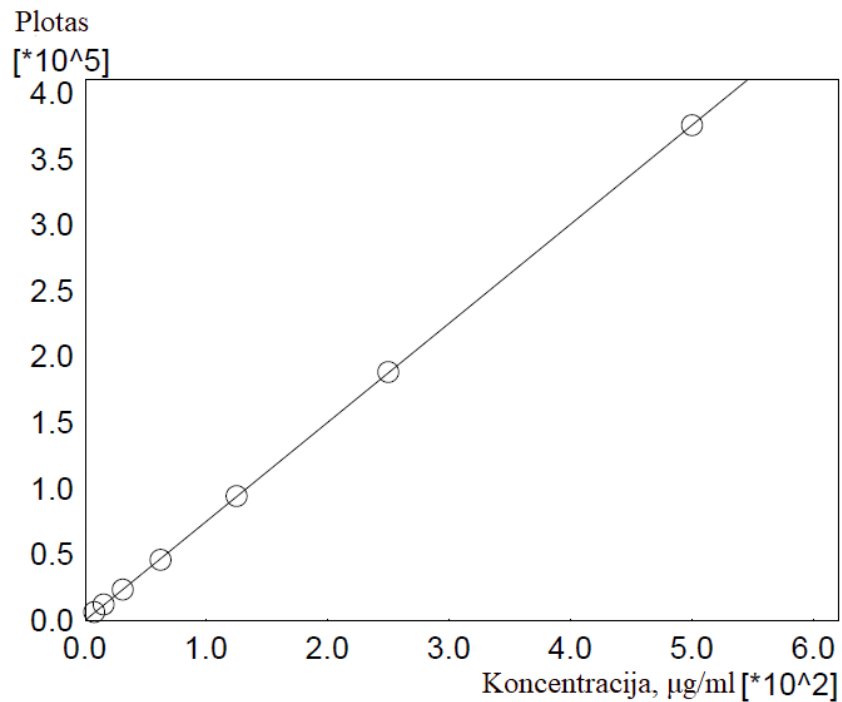
### 3.1.2.3. Efektyviosios skysčių chromatografijos tiesiškumas

Efektyviosios skysčių chromatografijos metodikos tiesiškumui nustatyti buvo brėžiama kalibracinė kreivė, parodanti smailės ploto priklausomybę nuo standartinio tirpalo koncentracijos (7 pav.). Šiai kreivei nubrėžti buvo pagaminti 7 L – karnitino standartiniai tirpalai, kurių koncentracijos buvo nuo 7,81 µg/ml iki 500 µg/ml. Pateikiama kalibracinės kreivės lygtis:

$$f(x) = 752,284 * x - 356,687$$

Koreliacijos koeficiento  $R^2$  reikšmė buvo lygi 0,9999836.

Atsižvelgiant į stebimą smailės ploto priklausomybę nuo L – karnitino koncentracijos (7 pav.), bei į apskaičiuotą koreliacijos koeficiento  $R^2$  reikšmę, kuri yra didesnė, nei 0,998, teigiama, jog sukurta ESC metodika pasižymi tiesiškumu ribose nuo 7,81  $\mu\text{g/ml}$  iki 500  $\mu\text{g/ml}$ .



7 pav. L – karnitino kalibracinė kreivė

### 3.1.2.4. L – karnitino aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribos, taikant efektyviosios skysčių chromatografijos metodą

L – karnitino aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribos pateikiamos žemiau:

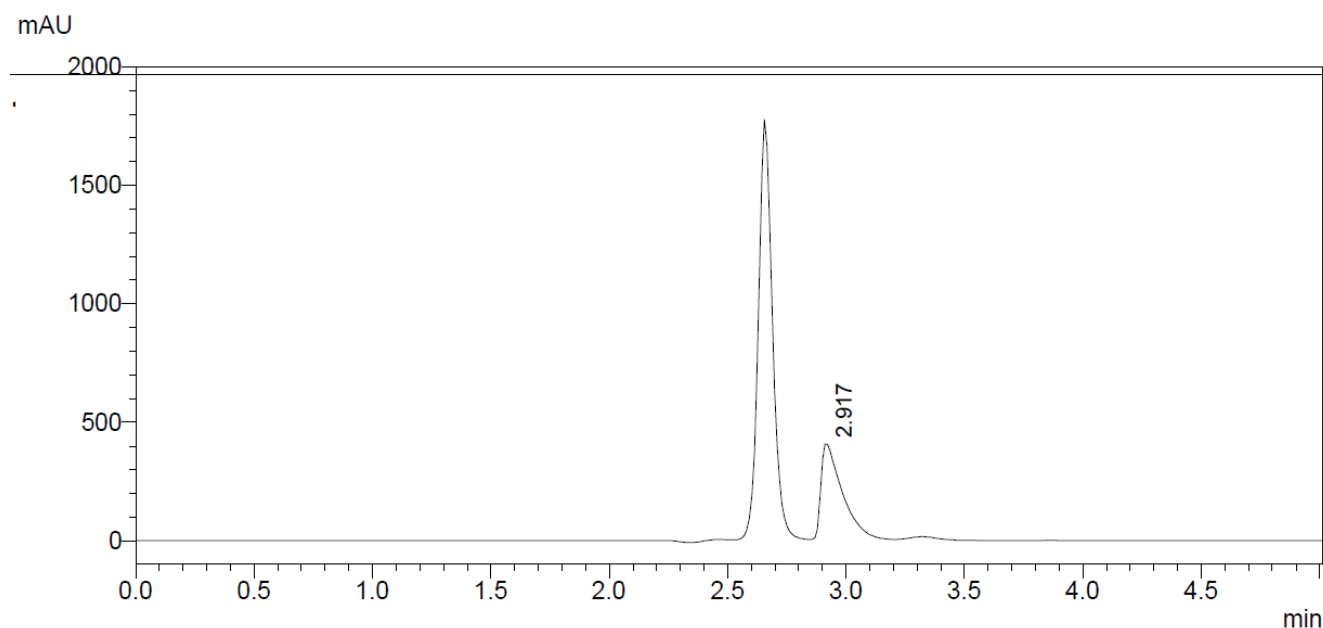
- Aptikimo riba: 104,82 ng/ml;
- Kiekybinio nustatymo riba: 317,63 ng/ml.

Apibendrinus visus aukščiau nagrinėtus metodo validacijos parametrus konstatuojama, jog sukurta specifiskumu, glaudumu ir tiesiškumu pasižyminti efektyviosios skysčių chromatografijos metodika L – karnitino kokybinei ir kiekybinei analizei atlikti.

### 3.1.3. L – karnitino maisto papildų kokybinės sudėties analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu

Maisto papildų, savo sudėtyje turinčių L – karnitino, kokybinis tyrimas buvo vykdomas lyginant kapsulių bandinių chromatogramas su standartinio tirpalo chromatograma. Siekiant identifikuoti L – karnitiną, kiekvieno iš penkių maisto papildų mėginio chromatogramoje matomos L – karnitino smailės sulaikymo laikas buvo palyginamas su standartinio tirpalo chromatogramoje užrašytos smailės (5 pav.) sulaikymo laiku. L – karnitino standartinio tirpalo chromatogramoje nustatytas sulaikymo laikas – 2,912 min., o kapsulių bandinių chromatogramose nustatyti L – karnitino sulaikymo laikai išvardijami sekančiai: K#1 – 2,829 min., K#2 – 2,864 min., K#3 – 2,799 min., K#4 – 2,915 min., K#5 – 2,917 min.

Kaip jau buvo užsiminta skirsnyje *Efektyviosios skysčių chromatografijos specifiškumas*, atliekant L – karnitino maisto papildų kokybinės sudėties vertinimą, mėginių chromatogramose stebėta dar viena labai ryški smailė (6 pav.). 8 pav. kaip pavyzdys pateikiama dar vieno kapsulių bandinio K#5 chromatograma, kurioje minėta smailė taip pat matoma.



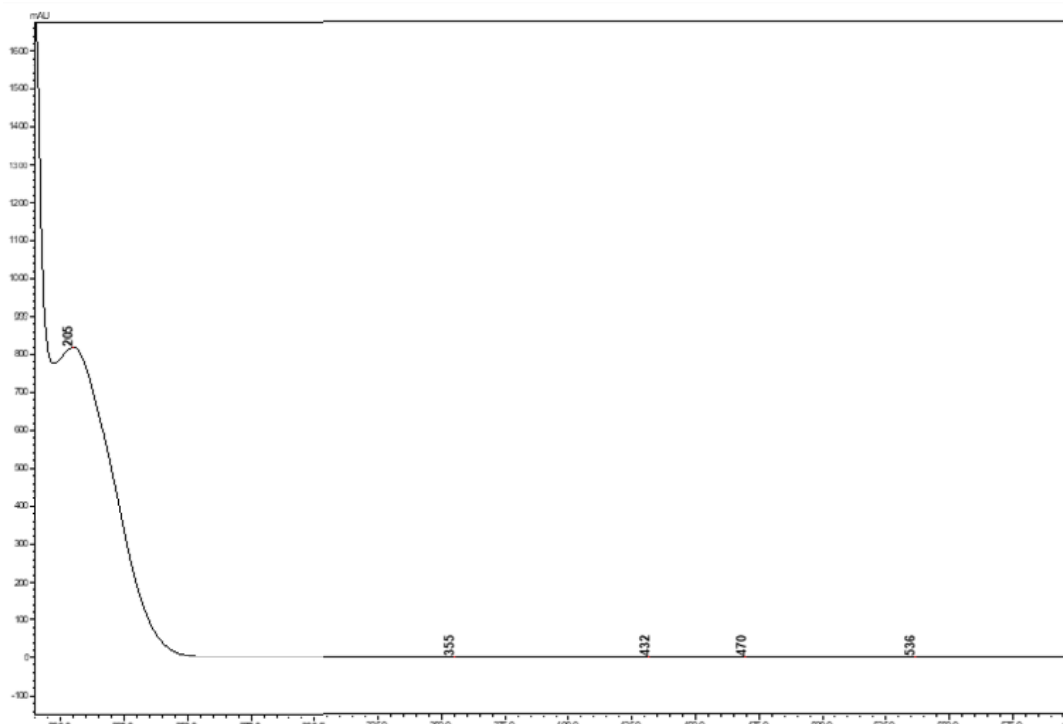
8 pav. Maisto papildo K#5 mėginio chromatograma

Žingsniai, kurių imtasi, norint nustatyti kapsulių bandinių sudėtyje esančią priemaišą ar bent jau kuo labiau priartėti prie šio junginio identifikacijos:

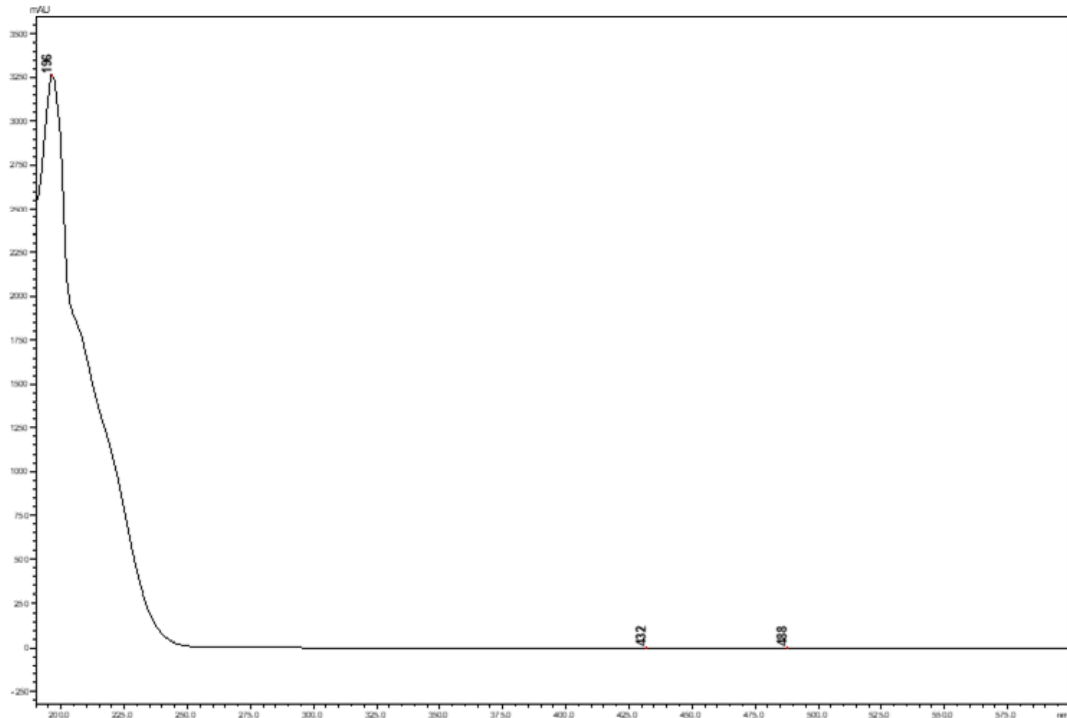
- Visų pirma, atmesta galimybė, jog priemaiša galėtų būti kuri nors į kapsulių sudėtį įeinanti pagalbinė medžiaga, nes, palyginus ant analizuotų maisto papildų pakuočių nurodytas jų kokybines sudėtis, nerasta nei vienos medžiagos, kuri atsikartotų visų kapsulių sudėtyse.

Svarbu paminėti, jog ant visų tyrimui pasirinktų maisto papildų pakuočių buvo nurodyta kapsules saugoti nuo tiesioginių saulės spindulių ir drėgmės, laikyti vėsioje, sausoje vietoje, ne aukštesnėje kaip 25 °C temperatūroje. Kapsulės tiek po jų išsigijimo, tiek laboratorijoje viso eksperimento metu buvo laikomos būtent taip.

- Pastebėjus neatpažintos medžiagos smailę maisto papildų bandinių chromatogramose, iš esmės peržiūrėta taikyta efektyviosios skysčių chromatografijos metodika, ypatingą dėmesį skiriant kolonėlėje palaikomai temperatūrai bei judančiosios fazės pH reikšmei. Nustatyta, jog kolonėlės temperatūra (30 °C) neviršijo mokslinėse publikacijose nurodytos temperatūros, priešingai, kai kurios tyrėjų grupės L – karnitino vertinimui pasirinko net aukštesnę temperatūrą [34, 39]. Kaip pavyzdys gali būti pateikiama Khoshkam R. ir kt. (2014) mokslininkų grupės pasirinkta kolonėlės temperatūra, kuri siekė net  $50 \pm 1$  °C arba Wang H. ir Xie S. (2017) bandymo metu kolonėlėje palaikyta 35 °C temperatūra [34, 39]. Aptariant judančiosios fazės pH pažymėtina, jog literatūros šaltiniuose dažnai sutinkamos pH reikšmės svyruoja nuo 2 iki 3, tad šio eksperimento metu palaikyta judančiosios fazės pH patenka į šį intervalą [7, 18, 39].
- Fotodiodų matricos detektoriumi kapsulių mėginiuose buvo išmatuoti L – karnitino ir neidentifikuotos priemaišos UV absorbcijos spektrai, kurie atitinkamai pateikiami 9 ir 10 pav.

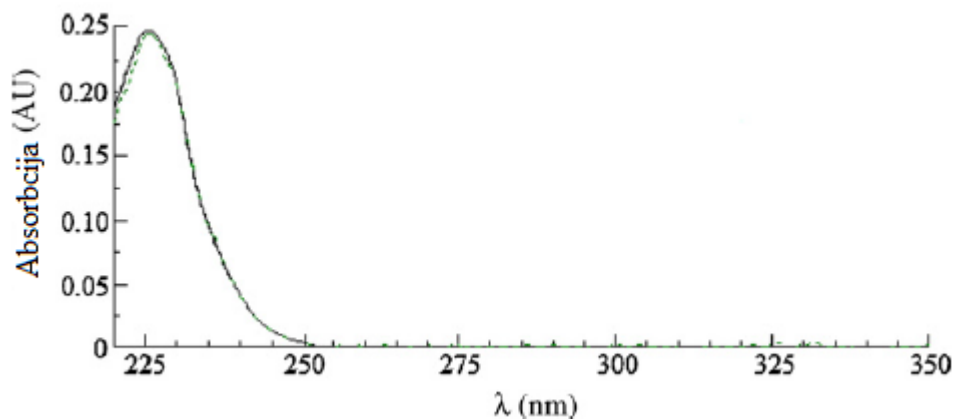


**9 pav. L – karnitino UV spektras, išmatuotas kapsulių K#1 mėginyje**



**10 pav. L – karnitino priemaišos UV spektras, išmatuotas kapsulių K#2 mėginyje**

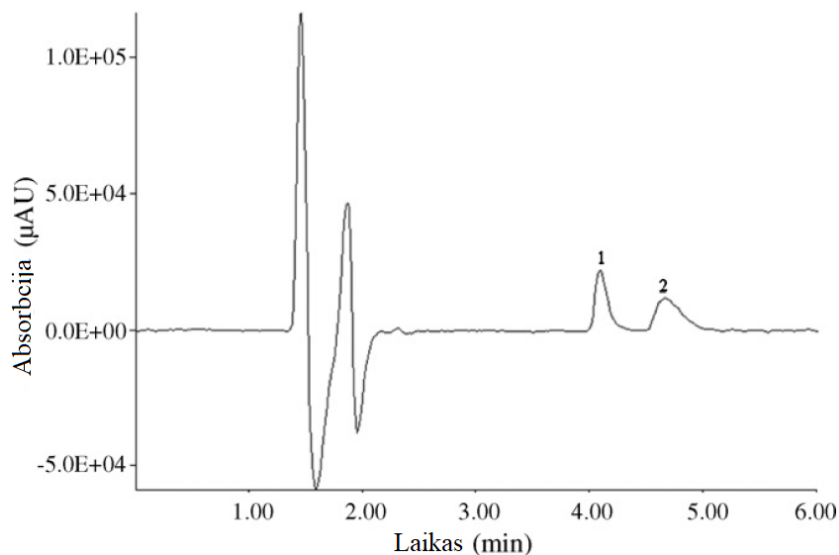
Išmatavus L – karnitino UV spektrą kapsulių K#1 mėginyje, absorbcijos maksimumas stebėtas esant 205 nm šviesos bangos ilgiui, o išmatavus L – karnitino priemaišos UV spektrą kapsulių K#2 mėginyje absorbcijos maksimumas stebėtas esant 196 nm šviesos bangos ilgiui. Nors abu šie spektrai yra labai panašūs, teigti, kad jie yra visiškai vienodi, negalima. Tuo tarpu moksliniame šaltinyje vaizduojami L – karnitino ir jo enantiomero D – karnitino UV spektrai vaizduojami kaip vienodi ir dengia vienas kitą (11 pav.) [7]. Kitos L – karnitino priemaišos – skilimo produkto krotonoilbetaino – UV absorbcijos spektras literatūroje palyginimui rastas nebuvo.



**11 pav. Moksliniame šaltinyje vaizduojami karnitino enantiomerų UV spektrai; punktyrinė linija žymi L – karnitiną, o tęstinė – D – karnitiną [7]**

- de Andrés F. ir kt. (2010) moksliniame straipsnyje pateikta ESC chromatograma, kurioje matomos krotonoilbetaino ir L – karnitino smailės (12 pav.), vertinant vizualiai, yra panaši į

atlikto eksperimentinio bandymo metu gautas chromatogramas (6 pav. ir 8 pav.) ir sufleruoja apie galimą krotonoilbetaino buvimą mėginiuose [7]. Savaiame suprantama, jog lyginamų chromatogramų panašumais medžiagos buvimas negali būti įrodomas, tačiau negali būti ir paneigiamas.



**12 pav. Efektyviosios skysčių chromatografijos chromatograma, kurioje matomos krotonoilbetaino (1) ir L – karnitino (2) smailės [7]**

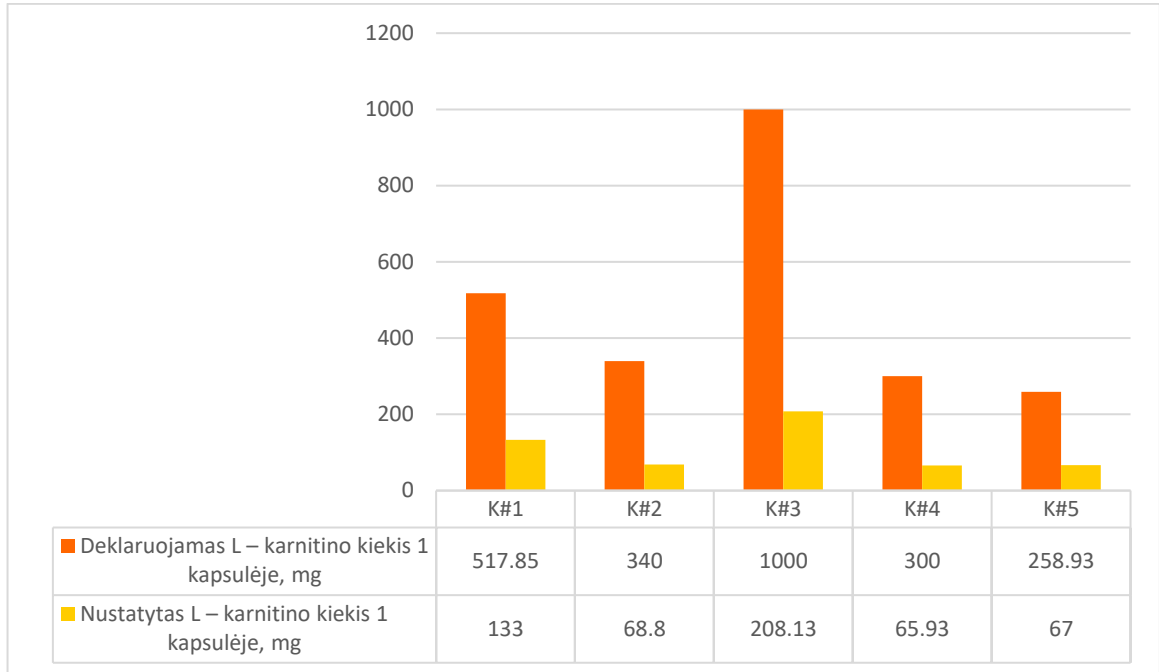
Susumavus visą surinktą ir susistemintą informaciją galimos L – karnitino priemonės klausimu prieita prie prielaidos, jog kapsulių mėginių chromatogramose matoma smailė, veikiausiai, nėra netinkamų chromatografinių sąlygų parinkimo padarinys. Manoma, jog pašalinis junginys galėtų būti laikant susidaręs L – karnitino skilimo produktas krotonoilbetainas, kuris maisto papildų sudėtyje buvo dar prieš pradėdant eksperimentinį tyrimą, arba į tirtas kapsules buvo dedama raceminio mišinio. Siekiant patvirtinti arba paneigti šią prielaidą, tikslingiausia būtų atlikti bandymus su krotonoilbetaino ir D – karnitino standartiniais tirpalais.

### **3.1.4. L – karnitino maisto papildų kiekybinės sudėties analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu**

Atliekant L – karnitino kiekybinį vertinimą maisto papilduose efektyviosios skysčių chromatografijos metodu, L – karnitinas buvo nustatytas visuose penkiuose tirtuose kapsulių mėginiuose. L – karnitino kiekis maisto papilduose buvo apskaičiuojamas pagal kalibracinės kreivės lygtį, gautą tiriant ESC tiesiškumą:

$$f(x) = 752,284 * x - 356,687$$

13 pav. šio eksperimento metu kiekvienoje kapsulėje (kaps.) nustatytas L – karnitino kiekis sugretinamas su ant maisto papildo pakuotės gamintojo deklaruojamu (arba, pagal nurodomą LKLT kiekį, perskaičiuotu) L – karnitino kiekiu vienoje kapsulėje.



**13 pav. Deklaruojamas L – karnitino kiekis 1 kapsulėje, mg ir ESC metodu nustatytas L – karnitino kiekis 1 kapsulėje, mg**

Pažvelgus į 13 pav. aiškiai matyti, jog visuose maisto papilduose nustatyti L – karnitino kiekiai ženkliai skiriasi nuo gamintojų nurodomų (arba, pagal deklaruotą LKLT kiekį, perskaičiuotų) L – karnitino kiekių vienoje kapsulėje. Tokie tyrimo rezultatai gali būti aiškinami skirsnyje *L – karnitino maisto papildų kokybinės sudėties analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu* prieita hipoteze, jog analizuotuose maisto papilduose L – karnitinas gali būti suskilęs į produktą krotonoilbetainą. Taip pat neatmetama ir racemino mišinio tikimybė, todėl tolimesni tyrimai, nukreipti į L – karnitino maisto papildų kokybinės sudėties vertinimo metu aptiktą priemaišą, yra labai reikalingi.

Didžiausias L – karnitino kiekis nustatytas kapsulėse K#3 –  $208,13 \pm 3,55$  mg/kaps., vietoje nurodomų 1000 mg/kaps., o mažiausias – kapsulėse K#4 –  $65,93 \pm 3,30$  mg/kaps., vietoje deklaruojamų 300 mg/kaps. Kapsulėse K#1 nustatyti  $133,00 \pm 2,36$  mg/kaps. L – karnitino, kuomet pagal nurodytą LKLT kiekį perskaičiuoto tiriamojo junginio deklaruojamas kiekis siekia 517,85 mg/kaps. Kapsulėse K#5 nustatytas L – karnitino kiekis buvo  $67,00 \pm 3,35$  mg/kaps., o pagal nurodytą LKLT kiekį perskaičiuotas medžiagos kiekis turėjo būti lygus 258,93 mg/kaps. Kapsulėse K#2

nustatyta  $68,80 \pm 4,16$  mg/kaps. L – karnitino, tuo tarpu ant maisto papildų pakuotės gamintojo deklaruojamas junginio kiekis – 340 mg/kaps.

Tikslinga kiekvienoje kapsulėje eksperimentiniu būdu nustatytą L – karnitino kiekį išreikšti procentine ant maisto papildų pakuočių deklaruojamo (arba, pagal nurodomus LKLT kiekius, perskaičiuoto) L – karnitino kiekio dalimi. Tokiu atveju kapsulių K#5 ir K#1 sudėtyse nustatyti L – karnitino kiekiai buvo arčiausiai pagal ant maisto papildų pakuočių deklaruojamus LKLT kiekius perskaičiuoto L – karnitino kiekio – atitinkamai 25,88 % ir 25,80 %. Likusių kapsulių sudėtyse gauti L – karnitino kiekiai kiekvieno maisto papildų atveju sudarė dar mažesnę ant kapsulių pakuotės nurodyto aktyviojo komponento kiekio procentinę dalį: K#4 – 21,98 %; K#3 – 20,81 %; K#2 – 20,24 %.

3 lentelėje pateikiami statistiniai kapsulių mėginiuose nustatyto L – karnitino kiekio duomenys.

*3 lentelė. Statistiniai kapsulių mėginiuose nustatyto L – karnitino duomenys*

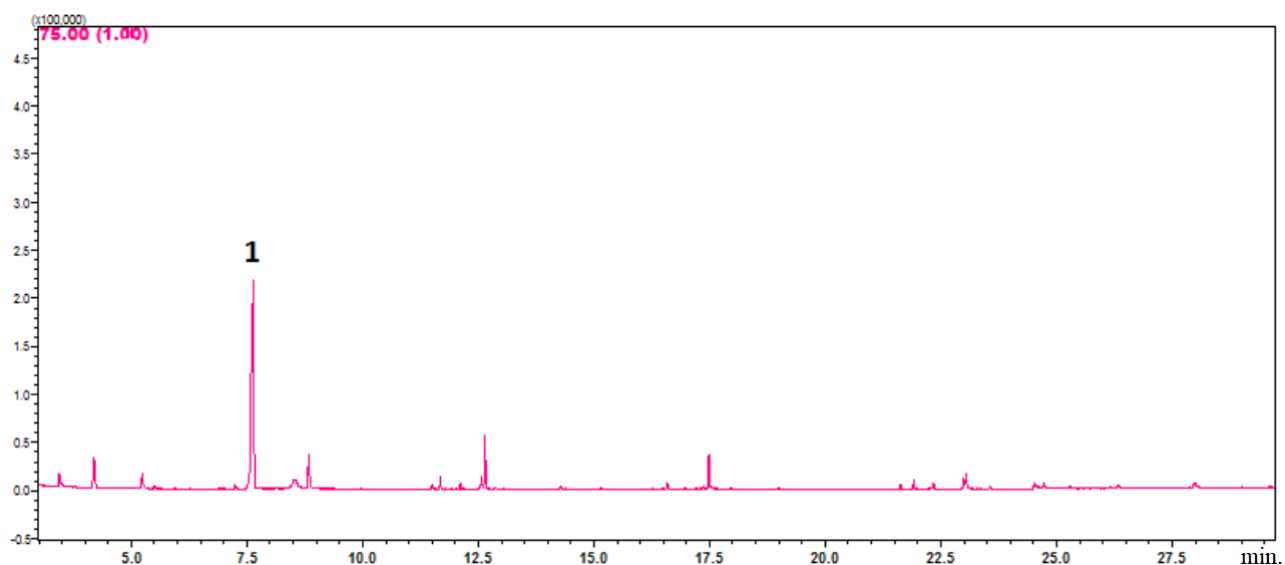
Kapsulių mėginys	Nustatyto L – karnitino kiekio vidurkis, mg/kaps.	Standartinis nuokrypis	Standartinė paklaida
K#1	133,00	2,36	1,37
K#2	68,80	4,16	2,40
K#3	208,13	3,55	2,05
K#4	65,93	3,30	1,90
K#5	67,00	3,35	1,93

## **3.2. L – karnitino kokybinė ir kiekybinė analizė dujų chromatografijos metodu**

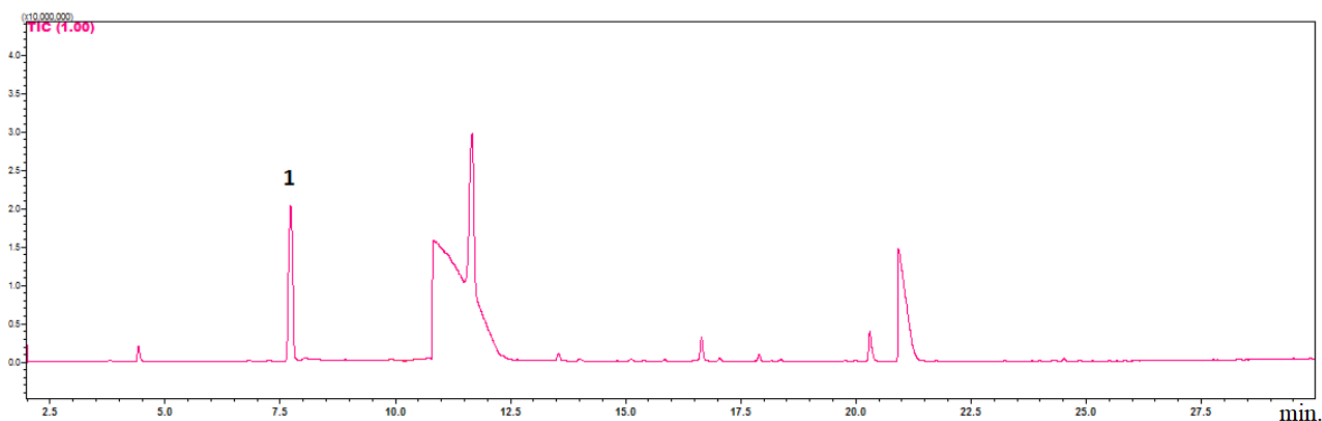
### **3.2.1. Dujų chromatografijos metodikos validacija**

#### **3.2.1.1. Dujų chromatografijos specifiškumas**

Kaip ir efektyviosios skysčių chromatografijos atveju, dujų chromatografijos specifiškumas buvo įrodytas palyginus L – karnitino standartinio tirpalo (14 pav.) ir pasirinkto maisto papildų bandinio (15 pav.) chromatogramas.



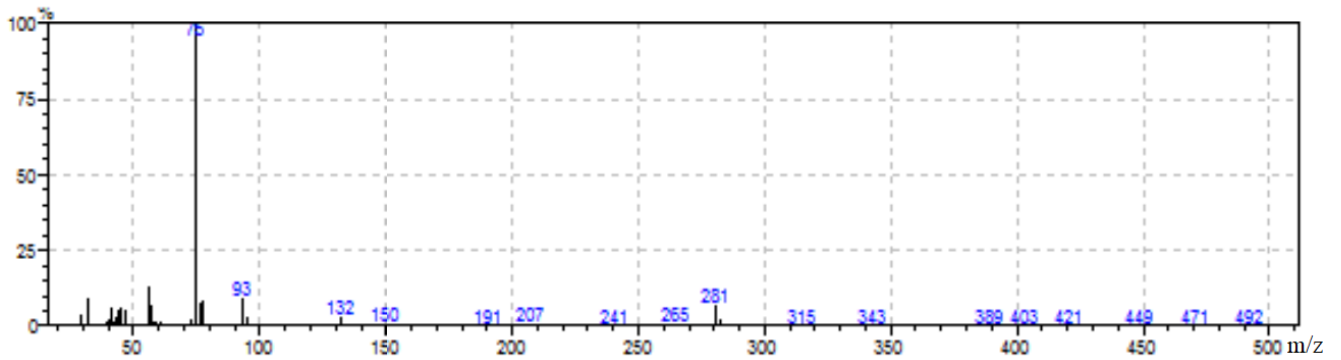
*14 pav. L – karnitino standartinio tirpalo chromatograma*



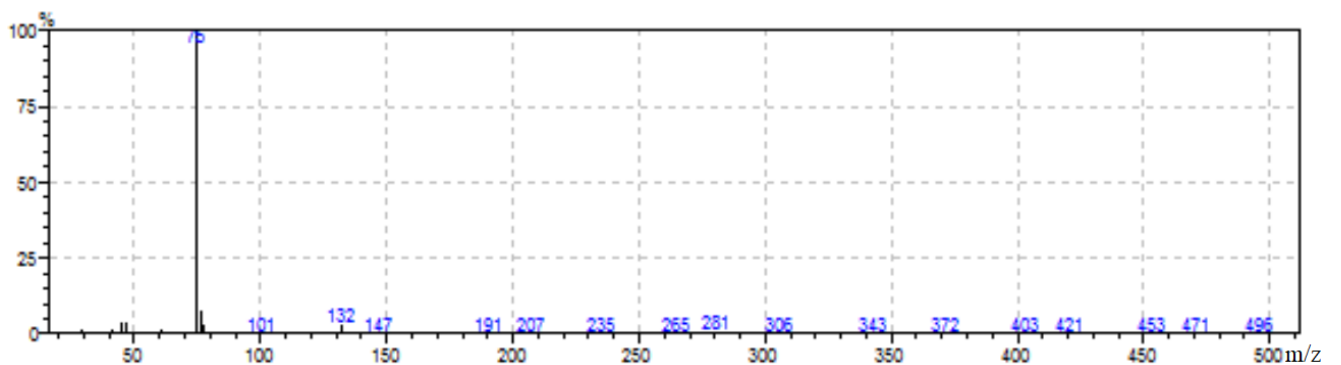
*15 pav. Pasirinkto maisto papildu mėginio chromatograma*

Abejose chromatogramose L – karnitino smailė žymima skaičiumi **1**, o pasirinkto kapsulių mėginio chromatogramoje (15 pav.), kaip ir ESC metodu užrašytose chromatogramose (6 pav. ir 8 pav.), matomos apie neidentifikuotą medžiagą bylojančios neatsiskyrusios smailės (taip pat matomos ir dar kelios mažesnės pašalinių medžiagų smailės). Gauta L – karnitino standartinio tirpalo sulaikymo trukmė – 7,727 min., o pasirinkto maisto papildu bandinio – 7,732 min., stebimas skirtumas tarp sulaikymo laikų – 0,005 min.

Taip pat 16 pav. ir 17 pav. pateikiami skaičiumi **1** pažymėtų smailių masių spektrai, atitinkamai gauti iš standartinio L – karnitino tirpalo ir iš pasirinkto kapsulių mėginio.



*16 pav. L – karnitino masių spektras, gautas iš standartinio tirpalo*



*17 pav. L – karnitino masių spektras, gautas iš pasirinkto maisto papildo mėginio*

Palyginus analizuojant standartinį tirpalą ir tiriant pasirinktą kapsulių bandinį gautus L – karnitino spektrus galima pastebėti, jog abiejuose spektruose sutampa jonų principinės reikšmės ties 75 m/z.

Apibendrinus DC metodu užrašytų L – karnitino standartinio tirpalo ir pasirinkto maisto papildo mėginio chromatogramų ir masių spektrų duomenis galima teigti, jog sukurta metodika yra specifiška L – karnitino nustatymui.

### **3.2.1.2. Dujų chromatografijos glaudumas**

Siekiant įrodyti dujų chromatografijos metodikos pakartojamumą, per tą pačią dieną L – karnitino standartinio tirpalo bandinys buvo injekuojamas 6 kartus, taikant tas pačias tyrimo sąlygas. DC metodikos tarpiniam preciziškumui įvertinti tiriamosios medžiagos standartinio tirpalo mėginys buvo tiriamas dvi dienas iš eilės po 6 kartus, taip pat nekeičiant eksperimentinių sąlygų. Tuomet abiem atvejais buvo apskaičiuojamas SSN sulaikymo laikui, o gauti skaičiavimų rezultatai pateikiami žemiau:

- SSN sulaikymo laikui, analizuojant pakartojamumą – 0,3 %;
- SSN sulaikymo laikui, tiriant tarpinį preciziškumą – 0,8 %.

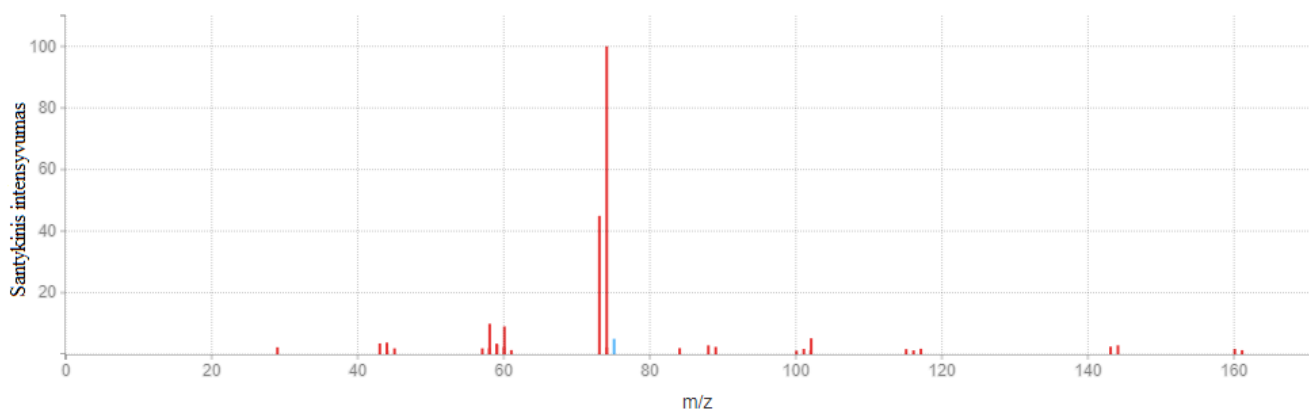
Nei apskaičiuoti DC metodikos pakartojamumo, nei tarpinio preciziškumo rezultatai neviršijo reglamentuojamų normų (atitinkamai – ne didesnis, nei 5 % SSN pakartojamumui ir ne didesnis, nei 10 % SSN tarpiniam preciziškumui), todėl galima tvirtinti, jog sukurtai DC metodikai yra būdingas glaudumas [38].

Susumavus visus aukščiau vertintus metodo tinkamumo patvirtinimo parametrus teigiama, jog sukurta specifiškumu ir glaudumu pažyminti dujų chromatografijos metodika L – karnitino kokybinei ir kiekybinei analizei atlikti.

### **3.2.2. L – karnitino maisto papildų kokybinės sudėties analizė dujų chromatografijos metodu**

L – karnitino maisto papildų kokybinis nustatymas buvo vykdomas lyginant kapsulių mėginių chromatogramose matomų L – karnitino smailių sulaikymo laikus su standartinio tirpalo chromatogramoje stebėtos smailės sulaikymo laiku (14 pav.). Kaip matyti iš 15 pav., dujų chromatografijos metodas patvirtino jau aptartos nenustatytos priemaišos buvimą L – karnitino maisto papildų sudėtyje, negana to, gauta ir dar keletas aiškiai matomų papildomų smailių (kaip pavyzdys 15 pav. pateikiama vieno pasirinkto maisto papildo bandinio chromatograma).

Tiesa, norint patvirtinti L – karnitino buvimą standartinio tirpalo bandinyje bei kapsulių mėginyje apskritai, skaičiumi **1** pažymėtų smailių masių spektrai, gauti iš L – karnitino standartinio tirpalo (16 pav.) ir iš kapsulių mėginių (kaip pavyzdys 17 pav. pateikiamas vieno pasirinkto maisto papildo masių spektras) buvo palyginti su duomenų bazėje publikuojamu DC – MS gautu L – karnitino masės spektru (18 pav.) [37, 40]. Jonų principinių reikšmių sutapimas ties 75 m/z visuose tarpusavyje palygintuose spektruose (16 pav., 17 pav. ir 18 pav.) leido skaičiumi **1** pažymėtą smailę priskirti L – karnitinui.

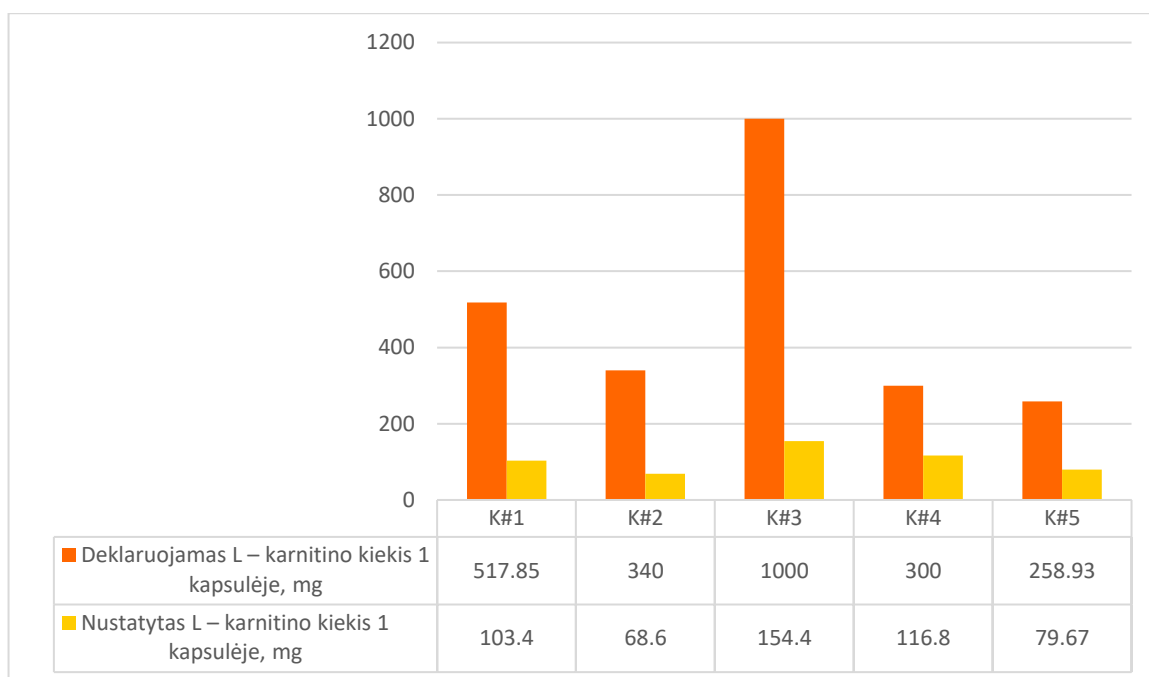


18 pav. Duomenų bazėje vaizduojamas L – karnitino masių spektras [37, 40]

### 3.2.3. L – karnitino maisto papildų kiekybinės sudėties analizė dujų chromatografijos metodu

Atliekant L – karnitino kiekybinį vertinimą maisto papilduose dujų chromatografijos metodu, L – karnitinas, kaip ir ESC taikymo atveju, buvo nustatytas visuose penkiuose analizuotuose kapsulių mėginiuose. L – karnitino kiekis maisto papilduose buvo apskaičiuojamas pagal L – karnitino smailių plotų santykį, palyginus smailių plotus, gautus tiriant kiekvieną kapsulių bandinį, su smailės plotu, užfiksuotu analizuojant standartinį tirpalą. 19 pav. dujų chromatografijos dėka kiekvienoje kapsulėje nustatytas L – karnitino kiekis lyginamas su gamintojo deklaruojamu (arba, pagal nurodomą LKLT kiekį, perskaičiuotu) L – karnitino kiekiu vienoje kapsulėje.

Pažvelgus į 19 pav. galima pastebėti, jog, kaip ir ištyrus pasirinktų maisto papildų kiekybinę sudėtį ESC metodu, visose kapsulėse nustatyti L – karnitino kiekiai ženkliai skiriasi nuo gamintojų nurodomų (arba, pagal deklaruotą LKLT kiekį, perskaičiuotų) L – karnitino kiekių vienoje kapsulėje. Turint omenyje, jog L – karnitino maisto papildų kokybinės sudėties analizė DC metodu patvirtino ESC metodu pastebėtos priemaišos buvimą kapsulių sudėtyje, toks nustatytų L – karnitino kiekių neatitikimas ant maisto papildų pakuočių nurodomų L – karnitino kiekių atrodo logiškas, rezultatai, gauti pasitelkus du skirtingus chromatografinius metodus, papildo vieni kitus.



**19 pav. Deklaruojamas L – karnitino kiekis 1 kapsulėje, mg ir DC metodu nustatytas L – karnitino kiekis 1 kapsulėje, mg**

Didžiausias L – karnitino kiekis nustatytas kapsulėse K#3 –  $154,40 \pm 3,96$  mg/kaps., vietoje deklaruojamų 1000 mg/kaps., o mažiausias – kapsulėse K#2 –  $68,60 \pm 2,17$  mg/kaps., vietoje nurodomų 340 mg/ kaps. Kapsulėse K#4 nustatyta  $116,80 \pm 1,77$  mg/kaps. L – karnitino, tuo tarpu ant maisto papildų pakuotės gamintojo deklaruojamas junginio kiekis – 300 mg/kaps. Kapsulėse K#1 nustatyti  $103,40 \pm 4,36$  mg/kaps. L – karnitino, kuomet pagal nurodytą LKLT kiekį perskaičiuoto tiriamąjo junginio deklaruojamas kiekis siekia 517,85 mg/kaps. Kapsulėse K#5 nustatytas L – karnitino kiekis buvo  $79,67 \pm 2,57$  mg/kaps., o pagal nurodytą LKLT kiekį perskaičiuotas medžiagos kiekis turėjo būti lygus 258,93 mg/kaps.

Dujų chromatografijos metodu kiekvienoje kapsulėje nustatytą L – karnitino kiekį išreiškus procentine gamintojo deklaruojamo L – karnitino kiekio dalimi, pastebėta, jog kapsulių K#4 sudėtyje nustatytas L – karnitino kiekis buvo arčiausiai ant maisto papildų pakuotės nurodomo aktyviojo komponento kiekio ir atitiko 38,93 % deklaruojamo L – karnitino kiekio. Tuo tarpu mažiausia procentinė gamintojo nurodomo L – karnitino kiekio dalis buvo nustatyta kapsulėse K#3 – tik 15,44 %. Kapsulėse K#5 gautas L – karnitino kiekis buvo lygus 30,77 % pagal ant maisto papildų pakuotės deklaruojamą LKLT kiekį perskaičiuoto L – karnitino kiekio. Kapsulėse K#2 ir K#1 nustatytos procentinės gamintojų deklaruojamų (arba, pagal nurodomus LKLT kiekius, perskaičiuotų) L – karnitino kiekių dalys mažai skyrėsi viena nuo kitos ir buvo atitinkamai 20,18 % ir 19,97 %.

4 lentelėje pateikiami statistiniai kapsulių mėginiuose nustatyto L – karnitino kiekio duomenys.

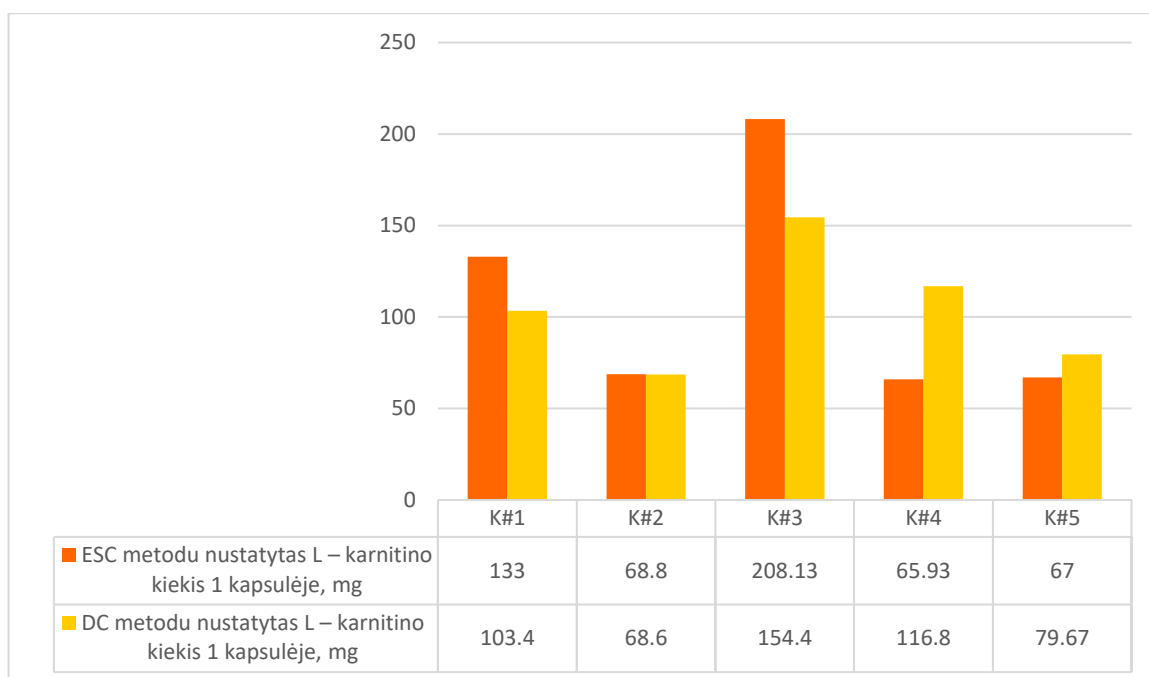
*4 lentelė. Statistiniai kapsulių mėginiuose nustatyto L – karnitino duomenys*

<b>Kapsulių mėginys</b>	<b>Nustatyto L – karnitino kiekio vidurkis, mg/kaps.</b>	<b>Standartinis nuokrypis</b>	<b>Standartinė paklaida</b>
K#1	103,40	4,36	2,52
K#2	68,60	2,17	1,25
K#3	154,40	3,96	2,29
K#4	116,80	1,77	1,02
K#5	79,67	2,57	1,48

### **3.3. Dviejų skirtingų metodų, pasirinktų L – karnitino kokybinei ir kiekybinei analizei, palyginimas**

Lyginant pasirinktų maisto papildų, savo sudėtyje turinčių L – karnitino, kokybiniam ir kiekybiniam nustatymui naudotas efektyviosios skysčių chromatografijos ir dujų chromatografijos metodikas, pirmiausia dėmesį atkreipia ESC greitumas ir paprastumas. Abiejų metodų taikymo atveju pirminis mėginių paruošimas buvo tapatus ir nesudėtingas, tačiau, dėl L – karnitino nelakumo, naudojant DC buvo reikalinga derivatizacijos procedūra, kurios pilnas atlikimas (kiekvieno mėginio išgarinimas po azoto dujų srove ir kaitinimas glicerolio vonelėje 2,5 valandos visų mėginių kartu) užtrukdavo iki keleto valandų.

Aptariant abiejų metodikų validacijos metu vertintus tinkamumo parametrus, pažymėtina, jog ESC buvo būdingas didesnis glaudumas, nei DC. Nustatant ESC pakartojamumą ir tarpinį preciziškumą, SSN L – karnitino sulaikymo laikui buvo atitinkamai 0,153 % ir 0,104 %, o įrodant DC pakartojamumą ir tarpinį preciziškumą SSN L – karnitino sulaikymo laikui buvo atitinkamai 0,3 % ir 0,8 %. Tiriant DC validacijos parametrus, priešingai nei ESC atveju, metodo tiesiškumas, aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribos vertinamos nebuvo, todėl pasirinkti chromatografiniai L – karnitino maisto papildų tyrimo metodai negali būti lyginami tarpusavyje pagal šiuos tinkamumo parametrus.



**20 pav. ESC ir DC metodais nustatytų L – karnitino kiekių 1 kapsulėje (mg) palyginimas**

20 pav. palyginami ESC ir DC metodais gauti L – karnitino maisto papildų kiekybinės sudėties analizės rezultatai. Nesunku pastebėti, jog dviem skirtingais chromatografiniais metodais gauti L – karnitino kiekiai atitinkamose kapsulėse vienas nuo kito skiriasi kur kas mažiau, nei kad kiekvienu iš šių metodų atskirai nustatytas L – karnitino kiekis visų maisto papildų atvejais skyrėsi nuo gamintojų deklaruojamų kiekių (13 pav. ir 19 pav.). Pavyzdžiui, tiriant kapsules K#2, skirtumas tarp abiem metodais nustatytų aktyviojo komponento kiekių buvo tik 0,20 mg/kaps. Šiek tiek didesnis rezultatų skirtumas pastebėtas atliekant kapsulių K#5 kiekybinį vertinimą – 12,67 mg/kaps., o kapsulėse K#1 šis skirtumas siekė 29,6 mg/kaps. Didžiausi skirtumai tarp šiais chromatografiniais metodais gautų L – karnitino kiekių užfiksuoti analizuojant kapsules K#3 ir K#4 – atitinkamai 53,73 mg/kaps. ir 50,87 mg/kaps. Apskritai atliekant kapsulių K#1, K#2 ir K#3 sudėtyje esančio L – karnitino analizę, ESC metodu gauti didesni šios medžiagos kiekiai vienoje kapsulėje, nei taikant DC metodą, o vykdant kapsulių K#4 ir K#5 tyrimus – priešingai, DC metodu gauti didesni L – karnitino kiekiai, nei ESC metodu.

## IŠVADOS

1. Naudojant pritaikytą ir validuotą efektyviosios skysčių chromatografijos metodiką, visuose pasirinktuose Lietuvoje notifikuotuose maisto papilduose nustatytas L – karnitinas ir dar viena neidentifikuota medžiaga, kuri, manoma, galėtų būti krotonoilbetainas arba D – karnitinas.
2. Kapsulių K#5 ir K#1 sudėtyse efektyviosios skysčių chromatografijos metodu nustatyti L – karnitino kiekiai buvo artimiausi gamintojų nurodomiems junginių kiekiams – atitinkamai 25,88 % ir 25,80 % šių kiekių, o kapsulių K#3 ir K#2 sudėtyse – labiausiai nuo jų nutolę (atitinkamai 20,81 % ir 20,24 % deklaruojamų kiekių).
3. Pritaikyta ir validuota dujų chromatografijos metodika patvirtino ne tik L – karnitino, bet ir neatpažintos priemaišos buvimą visuose pasirinktuose Lietuvoje notifikuotuose maisto papilduose.
4. Kapsulių K#4 sudėtyje dujų chromatografijos metodu gautas L – karnitino kiekis buvo artimiausias gamintojo deklaruojamam aktyviojo komponento kiekiui ir atitiko 38,93 % šio kiekio, o kapsulių K#3 sudėtyje – labiausiai nuo jų nutolęs ir atitiko 15,44 % nurodyto kiekio.
5. Šio eksperimento metu L – karnitino kokybinis ir kiekybinis vertinimas maisto papilduose taikant efektyviosios skysčių chromatografijos metodą buvo atliekamas greičiau, mat šis metodas nereikalauja laiku imlios derivatizacijos procedūros. Taip pat efektyviajai skysčių chromatografijai buvo būdingas didesnis glaudumas nei dujų chromatografijai.
6. Skirtumai tarp dviem skirtingais metodais gautų L – karnitino kiekybinės analizės rezultatų pasirinktuose Lietuvoje notifikuotuose maisto papilduose svyravo nuo 0,20 mg/kaps. iki 53,73 mg/kaps, kuomet mažiausiai skyrėsi rezultatai, stebėti ištyrus kapsules K#2, o labiausiai – išanalizavus kapsules K#3.

## **PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS**

Atliekant L – karnitino kokybinę analizę pasirinktuose Lietuvoje notifikuotuose maisto papilduose efektyviosios skysčių chromatografijos ir dujų chromatografijos metodais aptiktos priemaišos nenuginčijamam nustatymui rekomenduojama tęsti tyrimus su krotonoilbetaino ir D – karnitino standartiniais tirpalais.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Gaivenis M. Laisvų amino rūgščių nustatymas augalinėje žaliavoje dujų chromatografijos metodu. Kaunas: 2018.
2. Stukas R., Dobrovolskij V. Lietuvos gyventojų maisto papildų vartojimas ir jų požiūris į maisto papildus. „Visuomenės sveikata“ 2018; 2 (81): 64 – 68.
3. Kūno kultūros ir sporto departamentas prie Lietuvos Respublikos Vyriausybės. Sporto statistika. 2017 m. lapkričio mėn. Lietuvos gyventojų fizinio aktyvumo tyrimas [Internetas] [žiūrėta 2019 vasario 8]. Prieiga per internetą: <https://kksd.lrv.lt/lt/sporto-statistika>
4. Valstybinė maisto ir veterinarijos tarnyba. Maisto sauga. Maisto produktai. Maisto papildai. Notifikuotų maisto papildų sąrašas [Internetas] [žiūrėta 2018 gegužės 31]. Prieiga per internetą: <http://www.vet.lt/maisto-papildai/>
5. Ahn J. – H., Kwak B. – M., Park J. – M., Kim N. – K., Kim J. – M. Rapid Determination of L – Carnitine in Infant and Toddler Formulas by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Korean Journal for Food Science of Animal Resources 2014; 34 (6): 749 – 756.
6. Albreht A., Zupančič B., Vovk I. A Novel Derivatization Procedure and Chiral Gas Chromatographic Method for Enantiomeric Purity Screening of L – Carnitine. Acta Chimica Slovenica 2014; 61: 889 – 893.
7. de Andrés F., Castañeda G., Ríos Á. Achiral liquid chromatography with circular dichroism detection for the determination of carnitine enantiomers in dietary supplements and pharmaceutical formulations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2010; 51: 478 – 483.
8. An J. H., Kim Y. J., Kim K. J., Kim S. H., Kim N. H., Kim H. Y., Kim N. H., Choi K. M., Baik S. H., Choi D. S., Kim S. G. L – carnitine supplementation for the management of fatigue in patients with hypothyroidism on levothyroxine treatment: a randomized, double – blind, placebo – controlled trial. Endocrine Journal 2016; 63 (10): 885 – 895.
9. Cao Y., Qu H. – J., Li P., Wang C. – B., Wang L. – X., Han Z. – W. Single Dose Administration of L – Carnitine Improves Antioxidant Activities in Healthy Subjects. The Tohoku Journal of Experimental Medicine 2011; 224 (3): 209 – 213.
10. Castro – Puyana M., García – Ruiz C., Crego A. L., Marina M. L. Development of a CE – MS2 method for the enantiomeric separation of L/D – carnitine: Application to the analysis of infant formulas. Electrophoresis 2009; 30: 337 – 348.
11. Cruciani R. A., Zhang J. J., Manola J., Cella D., Ansari B., Fisch M. J. L – Carnitine Supplementation for the Management of Fatigue in Patients with Cancer: An Eastern

- Cooperative Oncology Group Phase III, Randomized, Double – Blind, Placebo – Controlled Trial. *Journal of Clinical Oncology* 2012; 30 (31): 3864 – 3869.
12. Dąbrowska M., Sieczka E., Starek M. TLC Assay of L – Carnitine in Dietary Supplements. *Journal of Planar Chromatography* 2012; 25 (5): 450 – 455.
  13. Dehdari Vais R., Yadegari H., Sattarahmady N., Heli H. An anodized nanostructure of Ni/Cu alloy synthesized in ethaline for electrocatalytic oxidation and amperometric determination of L – carnitine. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2018; 815: 134 – 142.
  14. European Pharmacopoeia 9.0 Council of Europe. Levocarnitine 01/2019:1339
  15. Galvano F., Li Volti G., Malaguarnera M., Avitabile T., Antic T., Vacante M., Malaguarnera M. Effects of simvastatin and carnitine versus simvastatin on lipoprotein(a) and apoprotein(a) in type 2 diabetes mellitus. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2009; 10 (12): 1875 – 1882.
  16. Geier D. A., Geier M. R. Autism spectrum disorder – associated biomarkers for case evaluation and management by clinical geneticists. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2008; 8 (6): 671 – 674.
  17. Geier D. A., Kern J. K., Davis G., King P. G., Adams J. B., Young J. L., Geier M. R. A prospective, double – blind, randomized clinical trial of levocarnitine to treat autism spectrum disorders. *Medical Science Monitor* 2010; 17 (6): 15 – 23.
  18. He G. – X., Dahl T. Improved high – performance liquid chromatographic method for analysis of L – carnitine in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2000; 23: 315 – 321.
  19. Hlais S., Reslan D. R. A., Saredidine H. K., Nasreddine L., Taan G., Azar S., Obeid O. A. Effect of Lysine, Vitamin B6, and Carnitine Supplementation on the Lipid Profile of Male Patients With Hypertriglyceridemia: A 12 – Week, Open – Label, Randomized, Placebo – Controlled Trial. *Clinical Therapeutics* 2012; 34 (8): 1674 – 1682.
  20. Ho J. Y., Kraemer W. J., Volek J. S., Fragala M. S., Thomas G. A., Dunn – Lewis C., Coday M., Häkkinen K., Maresh C. M. L – Carnitine L – tartrate supplementation favorably affects biochemical markers of recovery from physical exertion in middle – aged men and women. *Metabolism Clinical and Experimental* 2010; 59: 1190 – 1199.
  21. Isaguirre A. C., Acosta G., Cerutti S., Fernandez L. P. New flow injection method for quality control of dietary supplements containing L – carnitine using extraction mediated by sodium taurodeoxycholate coacervate coupled to molecular fluorescence. *Microchemical Journal* 2016; 129: 268 – 273.
  22. Kakou A., Megoulas N. C., Koupparis M. A. Determination of L – carnitine in food supplement formulations using ion – pair chromatography with indirect conductimetric detection. *Journal of Chromatography A* 2005; 1069: 209 – 215.

23. Kraemer W. J., Volek J. S., Dunn – Lewis C. L – Carnitine Supplementation: Influence upon Physiological Function. *Current Sports Medicine Reports* 2008; 7 (4): 218 – 223.
24. Malaguarnera M., Vacante M., Avitabile T., Malaguarnera M., Cammalleri L., Motta M. L – Carnitine supplementation reduces oxidized LDL cholesterol in patients with diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2009; 89: 71 – 76.
25. Mason P. *Dietary Supplements*. 4<sup>th</sup> ed. London: Pharmaceutical Press; 2012. p. 64 – 70.
26. Mingorance C., Rodríguez – Rodríguez R., Justo M. L., de Sotomayor M. A., Herrera M. D. Critical update for the clinical use of L – carnitine analogs in cardiometabolic disorders. *Vascular Health and Risk Management* 2011; 7: 169 – 176.
27. Molfino A., Cascino A., Conte C., Ramaccini C., Rossi Fanelli F., Laviano A. Caloric Restriction and L – Carnitine Administration Improves Insulin Sensitivity in Patients With Impaired Glucose Metabolism. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 2010; 34 (3): 295 – 299.
28. Motta M., Bennati E., Ferlito L., Passamonte M., Malaguarnera M. Insulin – resistance (IR) in older age. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 2008; 46: 203 – 209.
29. Pormsila W., Krähenbühl S., Hauser P. C. Determination of carnitine in food and food supplements by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis* 2010; 31: 2186 – 2191.
30. Qadir M. A., Ahmed M., Hussain W. A., Tahir M. S. Development and Validation of New HPLC Method for Simultaneous Estimation of L – Lysine Hydrochloride and L – Carnitine – L – Tartrate in Pharmaceutical Dosage Form. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015; 77 (4): 434 – 438.
31. Sánchez – Hernández L., Castro – Puyana M., García – Ruiz C., Crego A. L., Marina M. L. Determination of L – and D – carnitine in dietary food supplements using capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 2010; 120: 921 – 928.
32. Sánchez – Hernández L., García – Ruiz C., Crego A. L., Marina M. L. Sensitive determination of D – carnitine as enantiomeric impurity of levo – carnitine in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2010; 53: 1217 – 1223.
33. Strijbis K., Vaz F. M., Distel B. Enzymology of the Carnitine Biosynthesis Pathway. *IUBMB Life* 2010; 62 (5): 357 – 362.
34. Wang H., Xie S. Identification of L – carnitine and its impurities in food supplement formulations by online column – switching liquid chromatography coupled with linear ion trap mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 2017; 40 (2): 431 – 441.

35. Weissman J. R., Kelley R. I., Bauman M. L., Cohen B. H., Murray K. F., Mitchell R. L., Kern R. L., Natowicz M. R. Mitochondrial Disease in Autism Spectrum Disorder Patients: A Cohort Analysis. *PLOS ONE* 2008; 3 (11): e3815.
36. Zammit V. A., Ramsay R. R., Bonomini M., Arduini A. Carnitine, mitochondrial function and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2009; 61 (14): 1353 - 1362.
37. Allen F., Pon A., Greiner R., Wishart D. Computational Prediction of Electron Ionization Mass Spectra to Assist in GC/MS Compound Identification. *Analytical Chemistry* 2016; 88 (15): 7689 – 7697. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27381172>
38. ICH. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1) [Internetas] [žiūrėta 2018 lapkričio 13]. Prieiga per internetą: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)
39. Khoshkam R., Afshar M. Validation of a Stability – Indicating RP – HPLC Method for Determination of l – Carnitine in Tablets. *International Scholarly Research Notices* [Internet]. 2014 [cited 2019 Feb 14]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/481059>
40. PubChem. Levocarnitine. Human Metabolome Database. Predicted GC – MS Spectrum [Internetas] [žiūrėta 2019 kovo 14]. Prieiga per internetą: [http://www.hmdb.ca/spectra/c\\_ms/2967](http://www.hmdb.ca/spectra/c_ms/2967)
41. Stenerson K. K. The Derivatization and Analysis of Amino Acids by GC – MS. *Reporter US* 2011; 25: 1 – 3. Prieiga per internetą: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/articles/reporter-us/pdf/the-derivatization.pdf>
42. de Faria Coelho C., Mota J. F., de Paula Ravagnani F. C., Burini R. C. A suplementação de L – carnitina não promove alterações na taxa metabólica de repouso e na utilização dos substratos energéticos em indivíduos ativos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 2010; 54 (1): 37 – 44.