

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NANA GORJUP

**PRIPRAVA IN STABILIZACIJA REDUCIRANE OBLIKE  
KOENCIMA Q<sub>10</sub>**

**PREPARATION AND STABILIZATION OF REDUCED  
COENZYME Q<sub>10</sub>**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm., in somentorstvom doc. dr. Petre Kocbek, mag. farm. Vsi poizkusi in meritve so bili izvedene na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko in Katedri za farmacevtsko tehnologijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani.

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Robertu Roškarju, mag. farm., in somentorici doc. dr. Petri Kocbek, mag. farm., ki sta si vzela čas in me s strokovnimi nasveti in napotki vodila pri delu in nastajanju te diplomske naloge. Zahvalila bi se tudi Žani Temovi, mag. farm., ki mi je tekom praktičnega dela v laboratoriju vedno stala ob strani, me vodila in predajala praktične nasvete pri delu v laboratoriju. Hvala tudi ostalim diplomantom, s katerimi sem si delila laboratorij; zaradi vas je bilo vzdušje nadvse prijetno in delo potekalo hitreje. Posebna zahvala gre mojim bližnjim, ki so me tekom študija podpirali in verjeli, da mi bo uspelo.

## IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm., in somentorstvom doc. dr. Petre Kocbek, mag. farm.

Nana Gorjup

Predsednik komisije:

Prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

Član komisije:

Doc. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

## Vsebina

POVZETEK .....	III
SEZNAM OKRAJŠAV .....	V
1. UVOD .....	1
1.1 Koencim Q <sub>10</sub> .....	1
1.1.1 Lastnosti .....	1
1.1.2 Biosinteza in viri .....	2
1.1.3 Delovanje CoQ <sub>10</sub> .....	3
1.1.4 Redoks stanje in stabilnost koencima Q <sub>10</sub> .....	3
1.1.5 Dermalni nanos in absorpcija koencima Q <sub>10</sub> v kožo .....	4
1.1.6 Varnost in uporaba koencima Q <sub>10</sub> v kozmetičnih izdelkih.....	5
1.2 Staranje kože, oksidativni stres in lipidna peroksidacija.....	6
1.2.1 Antioksidanti .....	7
1.2.2 Koencim Q <sub>10</sub> kot antioksidant .....	8
1.3 Trdni lipidni nanodelci .....	9
1.3.1 Izdelava SLN.....	10
1.3.2 Vrednotenje SLN.....	10
1.3.3 Uporaba SLN v kozmetičnih izdelkih .....	11
2. NAMEN DELA.....	13
3. Eksperimentalni del.....	14
3.1 Materiali .....	14
3.1.1 Reagenti in standardi .....	14
3.1.2 Naprave in pribor .....	14
3.2 Metode.....	15
3.2.1 Analizna metoda.....	15
3.2.2 Redukcija oksQ <sub>10</sub> .....	20
3.2.3 Stabilnost rQ <sub>10</sub> v raztopinah .....	21
3.2.4 Priprava SLN.....	24
3.2.5 Stabilnostna študija SLN z vgrajenim rQ <sub>10</sub> .....	27
4. Rezultati in razprava.....	29
4.1 Analizna metoda.....	29
4.1.1 Prilagoditev analizne metode .....	29
4.1.2 Ovrednotenje metode .....	33
4.2 Postopek priprave reduciranega Q <sub>10</sub> .....	37

4.3	Stabilnost reduciranega Q <sub>10</sub> v raztopinah .....	40
4.3.1	Vpliv dejavnikov na stabilnost reduciranega Q <sub>10</sub> .....	40
4.3.2	Stabilizacija reducirane oblike Q <sub>10</sub> z antioksidanti.....	42
4.3.3	Stabilnost izbranih antioksidantov pri povišani temperaturi .....	45
4.4	Priprava SLN.....	46
4.4.1	Izdelava praznih SLN.....	46
4.4.2	Izdelava SLN z reducirano obliko CoQ <sub>10</sub> in antioksidanti .....	46
4.5	Stabilnost reduciranega CoQ <sub>10</sub> v SLN.....	48
4.5.1.	Fizikalna stabilnost SLN .....	48
4.5.2	Stabilnost reduciranega CoQ <sub>10</sub> v SLN.....	49
5.	ZAKLJUČEK.....	52
6.	LITERATURA.....	54

## POVZETEK

Koencim Q10 (CoQ<sub>10</sub>) je vedno bolj priljubljena sestavina kozmetičnih izdelkov za zrelo kožo, saj z leti njegova sinteza v telesu slabi in ga je potrebno dodatno vnašati v telo. V kozmetičnih izdelkih je CoQ<sub>10</sub> v oksidirani obliki, a so v koži encimi, ki ga deloma pretvarjajo v reducirano obliko CoQ<sub>10</sub>, ki je antioksidant. Deluje tako, da nevtralizira radikale, ki nastanejo zaradi UVA-sevanja tekom fotostaranja kože. Zato je uporaba reducirane oblike CoQ<sub>10</sub> v kozmetičnih izdelkih smiselna.

Osredotočili smo se na pripravo reducirane oblike CoQ<sub>10</sub> iz komercialno dostopne oksidirane oblike CoQ<sub>10</sub>. Preučevali smo vpliv različnih reducentov, vpliv masnega razmerja med reducentom in oksidirano obliko CoQ<sub>10</sub> ter vpliv medija. Optimalne pogoje za redukcijo smo dosegli v etanolni raztopini ob dodatku askorbinske kisline pri masnem razmerju 5:1 v korist reducenta. Popolna pretvorba v reducirano obliko je potekla po enem dnevu pri 60 °C. Zaradi nestabilnosti, smo v nadaljevanju preučevali vpliv nekaterih dejavnikov in dodatek antioksidantov na stabilnost reduciranega CoQ<sub>10</sub>. Reducirana oblika je bila stabilnejša pri višjih koncentracijah v etanolni raztopini, najbolj stabilizirana pa ob prisotnosti glutaciona.

Izbira dostavnega sistema je zelo pomembna. Izdelali smo trdne lipidne nanodelce, in sicer z dispergiranjem taline lipida v vodno raztopino stabilizatorjev z ultrazvočno sondo in preverili njihove fizikalne lastnosti. Z vgrajevanjem reducirane oblike CoQ<sub>10</sub> in antioksidantov, se je velikost delcev povečala za 300-400 nm, zeta potencial pa je padel na -1 mV do -2 mV, kar je nakazovalo na fizikalno nestabilnost delcev. Za analizo vzorcev smo uporabili metodo HPLC, ki smo jo predhodno prilagodili in ustrezno ovrednotili za ugotavljanje obeh oblik CoQ<sub>10</sub> v raztopinah in trdnih lipidnih nanodelcih.

Izvedli smo tudi stabilnostno študijo trdnih lipidnih nanodelcev z vgrajeno reducirano obliko CoQ<sub>10</sub>, nekaterim nanodelcem pa smo dodali še askorbinsko kislino in glutation. Vzorce smo shranjevali pri 4 °C, 25 °C in 40 °C ter v različnih časovnih točkah spremljali fizikalne lastnosti delcev in vsebnost reduciranega CoQ<sub>10</sub>. Reduciran CoQ<sub>10</sub> je bil v nanodelcih najbolj stabilen ob dodatku glutaciona (upad vsebnosti za približno 10 % po 21 dneh). Disperzije nanodelcev z vgrajenimi hidrofilnimi komponentami so bile fizikalno nestabilne, zato so potrebne nadaljnje raziskave za fizikalno stabilizacijo tovrstnih delcev. Zaključimo lahko, da smo uspeli uspešno stabilizirati reducirano obliko CoQ<sub>10</sub> s primernim postopkom izdelave reduciranega CoQ<sub>10</sub> in z uporabo ustreznega antioksidanta, tudi po vgradnji v disperzijo SLN.

Ključne besede: koencim Q<sub>10</sub>, reduciran koencim Q<sub>10</sub>, stabilnost, trdni lipidni nanodelci, HPLC.

## SEZNAM OKRAJŠAV

AK	askorbinska kislina
AKp	askorbilpalmitat
ATP	adenozintrifosfat
BHT	butilhidroksitoluen
CoQ <sub>10</sub>	koencim Q <sub>10</sub>
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija
EtOH	koncentrirani etanol
EtOH abs.	brezvodni etanol
GSH	glutation
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
KAS	kozmetično aktivna spojina
LD	laserska difrakcija
MeOH	metanol
oksQ <sub>10</sub>	oksidiran koencim Q <sub>10</sub> (ubikinon)
PAS	površinsko aktivna snov
PCS	fotonska korelacijska spektroskopija
PDI	polidisperzni indeks
R <sup>2</sup>	determinacijski koeficient
ROS	reaktivne kisikove spojine
RSD	relativna standardna deviacija
rQ <sub>10</sub>	reduciran koencim Q <sub>10</sub> (ubikinol)
SD	standardna deviacija
SEM	vrstična elektronska mikroskopija
SLN	trdni lipidni nanodelci
SOD	superoksid-dismutaza
ZP	zeta potencial

# 1. UVOD

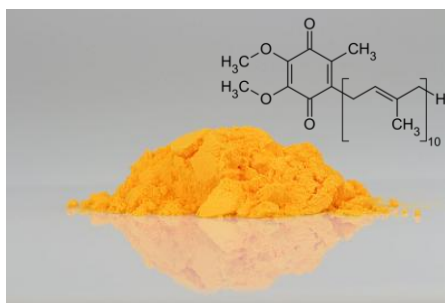
## 1.1 Koencim Q<sub>10</sub>

### 1.1.1 Lastnosti

Koencim Q (CoQ) predstavlja družino spojin z enakim benzokinonskim obročem, a z različno dolgo stransko verigo, sestavljeno iz izoprenskih enot. V vsakem organizmu prevladuje ena oblika CoQ. Najbolj pogost homolog CoQ, ki ga najdemo pri človeku in ostalih sesalcih, je CoQ z desetimi izoprenskimi enotami (trans-oblika) oz. tako imenovani CoQ<sub>10</sub> (1). Pri kvasovkah so našli CoQ s šestimi, pri glivah s sedmimi ter pri miših in školjkah z devetimi izoprenskimi enotami v stranski verigi (2).

Od začetka preučevanja CoQ<sub>10</sub>, njegove izolacije in poimenovanja ter nazadnje do ovrednotenja, je minilo okoli 30 let. Leta 1957 je raziskovalec dr. Frederic Crane izoliral snov, ki je bila pomembna pri oksidacijskih procesih. Neznana spojina je močno absorbirala pri 275 nm. Zaradi podobnosti z že znanimi spektri drugih kinonov jo je poimenoval Q275. V nadaljnjih študijah so isto spojino odkrili še v podganjih jetrih in jo poimenovali ubikinon, kar pomeni povsod prisoten kinon. Leta 1958, ko so dokončno ovrednotili spojino, je ta dobila ime CoQ<sub>10</sub>. Na področju raziskovanja vloge CoQ<sub>10</sub> v celičnih energetskih procesih je bila leta 1978 podeljena Nobelova nagrada s področja kemije dr. Petru Mitchellu iz Velike Britanije (2).

CoQ<sub>10</sub> (2,3-dimetoksi-5-metil-6-poliizoprenil-1,4-benzokinon) ima molekulska formulo C<sub>59</sub>H<sub>90</sub>O<sub>4</sub> in molekulska masa 863,34. Je rumenooranžen kristalinični prah brez okusa, z amfifilnimi lastnostmi, vendar ima zaradi dolge nepolarne stranske verige močan lipofilni značaj (slika 1). Temperatura tališča CoQ<sub>10</sub> je 48-52 °C (1).



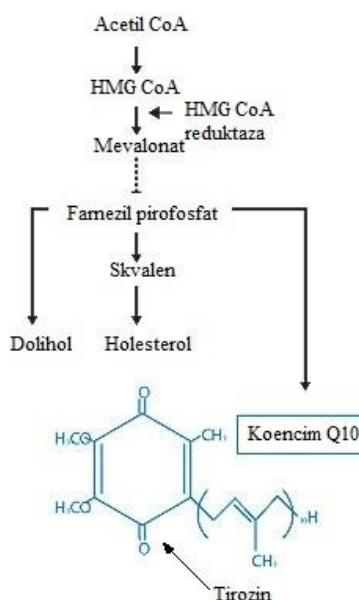
Slika 1: Koencim Q<sub>10</sub> in njegova strukturna formula, prirejeno po (3).



### 1.1.2 Biosinteza in viri

CoQ<sub>10</sub> je v vseh tkivih živali in rastlin. Čeprav je amfifilna molekula, ima zaradi lipofilne stranske verige močan lipofilni značaj. V telesu se zato pojavlja v treh oblikah: v micelnih agregatih, v lipidnih membranah ali vezan na proteine. V celicah našega telesa je 40 do 50 % vsega CoQ<sub>10</sub> v mitohondrijih, od 25 do 30 % v jedru, 15 do 20 % v endoplazemskem retikulumu in 5 do 10 % v citosolu. Zaradi njegovega delovanja ga največ najdemo v srcu, ledvicah in jetrih (2, 4).

Zaradi podobne strukture z nekaterimi vitamini ga nekateri uvrščajo med vitamine. To pa po definiciji za vitamine ne drži, saj le-teh telo ne more proizvesti in jih je treba v telo vnašati s hrano, medtem ko je CoQ<sub>10</sub> naše telo sposobno sintetizirati samo. Biosinteza poteka v treh glavnih stopnjah. Preko aminokislina tirozina poteka sinteza benzokinona. V ta 17-stopenjski proces je vključeno najmanj osem vitaminov (riboflavin, niacin, piridoksin, folna kislina, kobalamin, askorbinska kislina (AK), tokoferol in pantotenska kislina) in tudi nekaj elementov v sledovih (5). Preko mevalonatne poti iz acetil koencima A (acetil CoA) nastane izoprenska stranska veriga. Tako nastaneta hidrofilni in lipofilni del molekule CoQ<sub>10</sub>, ki se s kondenzacijo nato združita in nastane molekula CoQ<sub>10</sub> (slika 2) (6).



Slika 2: Prikaz biosinteze koencima Q<sub>10</sub>, prirejeno po (7).

V človeškem telesu je skupna količina CoQ<sub>10</sub> okoli 2 g. Dokazano je, da se z leti sinteza CoQ<sub>10</sub> manjša, zato ga je potrebno vnesti s hrano. Največ CoQ<sub>10</sub> so zasledili v rdečem mesu (govedina do 40 mg/kg) in ribah (sardine do 64 mg/kg). V velikem deležu ga vsebujejo tudi rastlinska olja (olivno olje do 160 mg/kg), zasledili so ga tudi v peteršilju, cvetači in avokadu (4).

Metode pridobivanja CoQ<sub>10</sub> (8, 9):

1. Ekstrakcija iz biološkega tkiva (trans-oblika)
2. Kemična sinteza (prevladuje trans-oblika, vendar prisotna tudi cis-oblika)
3. Fermentacija z uporabo bakterij in kvasovk (trans-oblika)

### **1.1.3 Delovanje CoQ<sub>10</sub>**

CoQ<sub>10</sub> je koencim različnim membranskim proteinom, s čimer jim omogoča pravilno delovanje. Zelo pomembno vlogo ima v verigi za prenos elektronov med kompleksi mitohondrijske dihalne verige (NADH:ubikinon-oksido-reduktaza, krajše NADH-dehidrogenaza (kompleks I), sukcinat:ubikinon-oksido-reduktaza, krajše sukcinat-dehidrogenaza (kompleks II) in ubinol:(feri)citokrom c-oksido-reduktaza, krajše citokrom c-reduktaza (kompleks III)), kjer nastaja energija v obliki adenzintrifosfata (ATP)). V krvni plazmi CoQ<sub>10</sub> primarno služi kot antioksidant, zato je tam večinoma ubinol, v mitohondrijih, kjer poteka celično dihanje in nastajanje energije, pa je pretežno v oksidirani obliki, ki se nato pretvarja v reducirano in nazaj (10). Glavni izvor reaktivnih kisikovih spojin (ROS) so mitohondriji, kjer CoQ<sub>10</sub> kot edini endogeni antioksidant ščiti telo pred nastalimi radikali. Zaradi svojih lipofilnih lastnosti se nahaja v celičnih membranah, s čimer jih tudi stabilizira (6).

### **1.1.4 Redoks stanje in stabilnost koencima Q<sub>10</sub>**

CoQ<sub>10</sub> je v telesu v treh oblikah (slika 3). Njegova biološka vloga temelji ravno na redoks ravnotežju. Ko oksidirana oblika CoQ<sub>10</sub> (ubikinon) sprejme dva elektrona in dva protona, nastane reducirana oblika CoQ<sub>10</sub> (ubinol). Semikinonski intermediat pa nastane po prenosu le enega elektrona in enega protona (11). Sama oblika pri zaužitju nima vpliva na funkcijo, saj pride do spontane pretvorbe ubikinona v ubinol. Tako je v krvni plazmi večinoma reducirana oblika CoQ<sub>10</sub> (4).



µg/g, po štirih urah pa 15 µg/g. Predpostavili so, da je podganja koža veliko bolj dovzetna za prehod snovi kot prašičja in človeška (8).

Dermalni nanos in sama absorpcija v kožo je odvisna tudi od oblike izbranega CoQ<sub>10</sub>. V študiji dveh starostnih skupin prostovoljcev, od 21 do 29 let in od 51 do 70 let, so prikazali, kako lahko oblika CoQ<sub>10</sub> vpliva na absorpcijo v zrelo oz. mlado kožo, in proučevali vpliv časovne izpostavitve (16). V študiji so uporabili oksidirano obliko CoQ<sub>10</sub> in obliko CoQ<sub>10</sub>, pridobljeno s fermentacijo kvasovk (9). Po enkratnem nanosu se je oksidirana oblika slabše absorbirala v kožo kot oblika CoQ<sub>10</sub>, pridobljena s fermentacijo. S starostjo se zgradba kože spremeni, prav tako je povečana lipidna peroksidacija v koži, posledično je absorpcija CoQ<sub>10</sub> pri tej starostni skupini veliko večja kot pri zdravi, mladi koži, katere funkcija obrambe organizma pred zunanji dejavniki še ni oslABLJENA. Količina peroksidov v roženi plasti kože se je po daljši uporabi obeh oblik CoQ<sub>10</sub> zmanjšala (16).

#### **1.1.6 Varnost in uporaba koencima Q<sub>10</sub> v kozmetičnih izdelkih**

Zaradi povečane uporabe kozmetičnih izdelkov s CoQ<sub>10</sub> je potrebno ovrednotiti tudi njegov toksikološki profil. Za določitev iritacijskega potenciala spojine so naredili *in vivo* obilni test na skupini prostovoljcev. Študija je bila zasnovana kot dvojna slepa študija. Izkazalo se je, da 0,3 % CoQ<sub>10</sub> ne povzroča draženja na koži. Njegova uporaba je primerna tudi za ljudi, ki imajo občutljivo kožo. Prav tako nima mutagenih, kancerogenih in citotoksičnih lastnosti, tako da je njegova uporaba v kozmetičnih izdelkih do koncentracije 1 % varna (8).

CoQ<sub>10</sub> v kozmetičnih izdelkih uporabljamo predvsem kot antioksidant in *Skin-Conditioning Agent* (snov, ki poskrbi za gladko, mehko in prožno kožo). Najdemo ga v kozmetičnih izdelkih proti gubam v koncentracijah od 0,5 do 1,0 %, v nekaterih drugih kozmetičnih izdelkih tudi v koncentraciji do 3 %. V izdelkih, kjer ima vlogo antioksidanta, je njegova koncentracija nižja od 1 %. Najdemo ga tudi v izdelkih za zaščito pred soncem (8). V epidermisu je 10-krat večji delež reduciranega Q<sub>10</sub> kot v dermisu, saj je v epidermisu velik delež NADPH:kinon-reduktaz, ki omogočijo pretvorbo oksidirane oblike CoQ<sub>10</sub> v reducirano (1, 17). Ker je v koži večinoma reduciran CoQ<sub>10</sub>, je pomembno, da s kozmetičnimi izdelki na kožo nanašamo to obliko CoQ<sub>10</sub>.

## 1.2 Staranje kože, oksidativni stres in lipidna peroksidacija

Staranje kože je naravni proces, pri katerem pride do sprememb v strukturi kože. Poznamo dve vrsti staranja, in sicer kronološko (intrinzično) staranje ter fotostaranje (ekstrinzično). Kronološkega staranja ni moč ustaviti, saj gre za kontinuiran proces. Z leti se zmanjšuje aktivnost hormonov, kar vpliva na procese v koži. Prav tako je kronološko staranje povezano z genetiko. Najpogostejša značilnosti kronološkega staranja je nastanek gub, zmanjša se elastičnost in debelina kože, poveča se krhkost kapilar, zmanjša se število Langerhansovih celic in fibroblastov. Koža postane suha, bolj občutljiva, poveča se transepidermalna izguba vode. Fotostaranje je posledica zunanjih dejavnikov, kot so ionizirajoče sevanje, slaba prehrana, stres, kemikalije v okolju, kajenje in drugi. Za razliko od kronološkega staranja se tej vrsti staranja lahko izognemo oz. ga upočasnimo. Poleg vseh teh okoljskih dejavnikov k fotostaranju največ prispeva UV-sevanje (18). Sevanje UV-svetlobe razdelimo lahko na tri tipe, UVA, UVB in UVC. UVC ( $\lambda = 100\text{--}290\text{ nm}$ ) za našo kožo ni problematično, saj se velik del ustavi v plasti ozona. UVB ( $\lambda = 290\text{--}320\text{ nm}$ ) prodre le do epidermisa in povzroči sončne opekline na koži. Za večje poškodbe kože je krivo UVA-sevanje ( $\lambda = 320\text{--}400\text{ nm}$ ), saj lahko prodre vse do dermisa. Spodbudi nastanek radikalov, ki vplivajo na celične proteine, membrane in DNA ter povzročijo oksidativni stres. Zaradi UV-sevanja pride do verižnih reakcij v koži, rezultat katerih je zmanjšanje in sprememba kolagenskih in elastinskih vlaken, kar vodi do nastanka gub in povešene kože. Klinične spremembe pri fotostaranju so gube, pojav starostnih peg, stanjšanje kože, vidne žile, usnjata koža, aktinična keratoza in druge. Pride lahko tudi do kroničnega vnetja, zmanjša se število Langerhansovih celic (19).

Oksidativni stres je neposredna posledica škodljivega delovanja povečane količine ROS na celice in tkiva v organizmu. Pri tem gre za preveliko tvorbo radikalov in/ali zmanjšane učinkovitosti antioksidativnih sistemov. Število radikalov se lahko poveča zaradi dejavnikov okolja (povečano UV-sevanje in onesnaženost okolja, neprimerna prehrana, uživanje alkohola, kajenje, psiho-emocionalni stres, bolezni, zdravila), fizikalni dejavniki (ionizirajoče in UV-sevanje), kemijski dejavniki, biološki dejavniki (bakterije) (20).

Lipidna peroksidacija je lokalizirana oksidacija fosfolipidov v bioloških membranah, ki jo sprožijo dovolj reaktivni radikali. Sprožilni radikal je lahko vsak radikal, ki lahko fosfolipidni molekuli odvzame vodikov atom. Proces lahko razdelimo na tri dele (12):

1. faza (inicijacija) je začetek oksidacije lipidov. Le reaktivni radikali lahko sprožijo to fazo.
2. faza (propagacija) je širitev oksidacije, v membrani se vzpostavi verižni sistem oksidacij, ki ga poganja kisik.
3. faza (terminacija) je zaključek oksidacije lipidov. V tej fazi se oksidacija konča.

### 1.2.1 Antioksidanti

Antioksidanti so snovi, ki znatno upočasnijo ali preprečijo oksidacijo pomembnih celičnih sestavin, tako da reagirajo z radikali in zaustavijo verižne radikalske reakcije. V svoji strukturi imajo vsaj en reaktiven vodik, ki se odcepi in nevtralizira radikal. Antioksidante delimo na encimske (superoksid-dismutaza – SOD, katalaza, glutation peroksidaza) in neencimske (glutation – GSH, tioredoksin). Glede na topnost jih delimo na hidrofilne in lipofilne; glede na možnost regeneracije na obnovljive in neobnovljive; glede na izvor na endogene (bilirubin, CoQ, lipojska kislina) in eksogene (vitamin E, vitamin C, karotenoidi); ter glede na mehanizem delovanja na neposredne (prekinejo verižno reakcijo) in posredne (kelatorji kovinskih ionov) (20). Dobri biološki antioksidanti so tisti, ki (i) uspešno odstranijo peroksi radikale in (ii) katerih radikali so stabilni oz. niso reaktivni, da bi povzročili škodo v bioloških molekulah (21).

Načini delovanja antioksidantov (20):

- Katalitično odstranjevanje radikalov in drugih ROS (SOD, katalaza ...)  
 $AH + ROO\cdot \rightarrow A\cdot + ROOH$   
 Reducent (AH) je donor vodikovega atoma peroksi radikal (ROO<sup>·</sup>), s tem nastane relativno stabilen hidroperoksid (ROOH) in radikal antioksidanta (A<sup>·</sup>) (21).
- GSH, AK, β-karoten in podobne nizko molekularne snovi so t. i. lovilci radikalov, ki delujejo tako, da reagirajo z radikali in jih tako nevtralizirajo, sami pa pri tem postanejo radikali;
- Nekateri proteini (npr. transferini) reagirajo s prooksidanti (železovi, bakrovi ioni, hem) in s tem zmanjšajo njihovo razpoložljivost ter tako preprečijo nastanek predvsem hidroksilnega radikala in razgradnjo lipidnih peroksidov.

### 1.2.2 Koencim Q<sub>10</sub> kot antioksidant

CoQ<sub>10</sub> deluje kot prenašalec elektronov v dihalni verigi v mitohondrijih. Njegova reducirana oblika (ubikinol – CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) je zelo učinkovit antioksidant v celični membrani. *In vitro* lahko ubikinol odstranjuje peroksilni radikal (LOO<sup>•</sup>) in zavira lipidno peroksidacijo (15). Kemijska reakcija 1 prikazuje delovanje ubikinola kot antioksidanta, reakcija 2 prikazuje disproporcionacijo semikinona na ubikinol in ubikinon, 3. reakcija prikazuje, kako semikinon reagira s peroksi radikalom (22).

1.  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2 + \text{L-OO}^\bullet \rightarrow \text{CoQ}_{10}^\bullet + \text{H}^+ + \text{L-OOH}$
2.  $2\text{CoQ}_{10}^\bullet + \text{H}^+ \rightarrow \text{CoQ}_{10}\text{H}_2 + \text{CoQ}_{10}$
3.  $\text{CoQ}_{10}^\bullet + \text{H}^+ + \text{L-OO}^\bullet \rightarrow \text{CoQ}_{10} + \text{L-OOH}$

V membranah in lipoproteinih najdemo tudi  $\alpha$ -tokoferol, ki deluje kot antioksidant in nevtralizira radikale. Ob nevtralizaciji radikala sam postane radikal. V tej stopnji ubikinol nastopi kot obnovitelj  $\alpha$ -tokoferola. Ob tem nastane semikinon, ki nadalje lahko reagira s kisikom, kjer nastane superoksidni radikal, ki je manj nevaren kot peroksilni radikal, ali pa reagira z  $\alpha$ -tokoferolnim radikalom, pri čemer nastane ubikinon in  $\alpha$ -tokoferol (15).

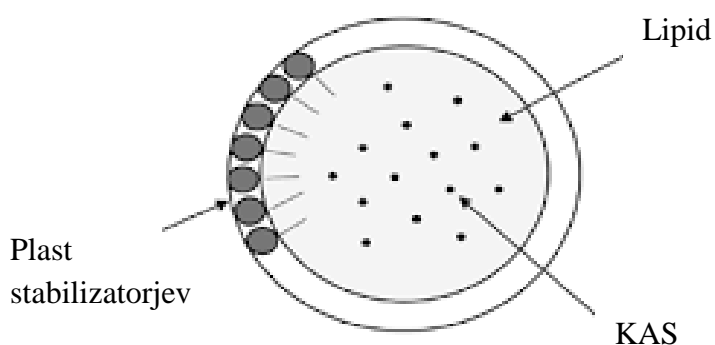
Potencialne reakcije CoQ<sub>10</sub> z  $\alpha$ -tokoferolom (15):

1.  $\text{L-OO}^\bullet + \alpha\text{-TOH} \rightarrow \text{LOOH} + \alpha\text{-TO}^\bullet$
2.  $\alpha\text{-TO}^\bullet + \text{CoQ}_{10}\text{H}_2 \rightarrow \alpha\text{-TOH} + \text{CoQ}_{10}\text{H}^\bullet$
3.  $\text{CoQ}_{10}\text{H}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{CoQ}_{10} + \text{O}_2^{\bullet -}$
4.  $\text{CoQ}_{10}\text{H}^\bullet + \alpha\text{-TO}^\bullet \rightarrow \text{CoQ}_{10} + \alpha\text{-TOH}$

### 1.3 Trdni lipidni nanodelci

Z vgrajevanjem v različne nanodostavne sisteme se strokovnjaki trudijo povečati prehajanje CoQ<sub>10</sub> v kožo. Kot uspešna pristopa sta se že izkazala vgrajevanje CoQ<sub>10</sub> v liposome in v nanoemulzije (5).

Trdni lipidni nanodelci (ang. *solid lipid nanoparticles* – SLN) so trdni koloidni delci v velikosti od 50 do 1000 nm. Leta 1991 so jih razvili kot alternativo drugim koloidnim dostavnim sistemom, kot so mikroemulzije, liposomi, miceli in nanosuspenzije. Za razliko od ostalih koloidnih dostavnih sistemov, ki jih sestavljajo tekoči lipidi, so SLN zgrajeni iz lipidov, ki so pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju. Poleg lipidov tvorijo SLN še površinsko aktivne snovi (PAS) in voda. Za izdelavo SLN najpogosteje uporabljamo naslednje lipide: mono-, di-, trigliceride, višje maščobne kisline in voske. PAS največkrat predstavljajo fosfolipidi. Zgradba SLN omogoča vgrajevanje lipofilnih in tudi hidrofilnih kozmetično aktivnih spojin (KAS). Zgradba SLN je prikazana na Sliki 4. Uporaba trdnih lipidov omogoča nadzorovano sproščanje vgrajenih KAS in poveča njihovo stabilnost. Prednost tega dostavnega sistema so tudi možnost industrijske izdelave, izdelava brez organskih topil in sestavine, ki so fiziološko sprejemljive in biorazgradljive. Kritične točke SLN so možnost razgradnje KAS med samo izdelavo, ostanek KAS na površini delcev, geliranje in možnost rasti delcev (23).



Slika 4: Zgradba SLN, prirejeno po (24).



### 1.3.1 Izdelava SLN

Za izdelavo SLN poznamo več metod. Mednje spada izdelava SLN s homogenizacijo pod visokim tlakom, ki jo delimo na hladno in vročo homogenizacijo. Pri obeh metodah KAS dispergiramo v raztaljen lipid. Pri vroči homogenizaciji tej talini dodamo vodno raztopino PAS segreto na enako temperaturo kot lipid s KAS. Dobljeno zmes nato homogeniziramo v homogenizatorju, da nastane emulzija O/V. Med ohlajanjem pri sobni temperaturi lipid kristalizira in iz lipidnih kapljic nastanejo SLN. Začetek v procesu hladne homogenizacije je enak kot pri vroči, le da nato talino lipida s KAS hitro ohladimo (s pomočjo tekočega dušika). Ohlajen lipid s KAS nato zmeljemo na delce velikosti 50 – 100  $\mu\text{m}$ , jim dodamo hladno vodno raztopino stabilizatorjev, nato pa pod visokim tlakom zmes homogeniziramo, da nastanejo SLN. Med procesom visokotlačne homogenizacije pride do povišanja temperature, zato je izbira sestavin izrednega pomena. (25)

SLN lahko pripravimo tudi z razredčevanjem mikroemulzije. Staljenim lipidom dodamo vodno raztopino s PAS, segreto na enako temperaturo kot lipid, tako da nastane optično transparentna zmes (mikroemulzija). Z nežnim mešanjem segreto mikroemulzijo dispergiramo v hladno vodo (2–3 °C). S tem izločimo vpliv strižnih sil na velikost delcev. SLN nastanejo med ohlajanjem (25).

Metoda izdelave, ki smo jo uporabili pri pripravi naših vzorcev, je dispergiranje lipidov v vodno raztopino stabilizatorjev z rotor-stator homogenizatorjem ali z ultrazvočno sondo. Talino lipidov smo dispergirali v vodno raztopino stabilizatorjev in homogenizirali s pomočjo ultrazvočne sonde. Segreto emulzijo je za nastanek SLN potrebno ohladiti. Pomanjkljivost te metode je, da običajno nastane določen delež večjih delcev (25).

SLN se lahko pripravimo tudi z emulgiranjem in odparevanjem topila. Lipid raztopimo v organskem topilu, ki se ne meša z vodo. Tako pripravljeno raztopino emulgiramo v vodno fazo, da nastane O/V emulzija. Naslednja faza je odparevanje topila pri znižanem tlaku in nastanek SLN (25).

### 1.3.2 Vrednotenje SLN

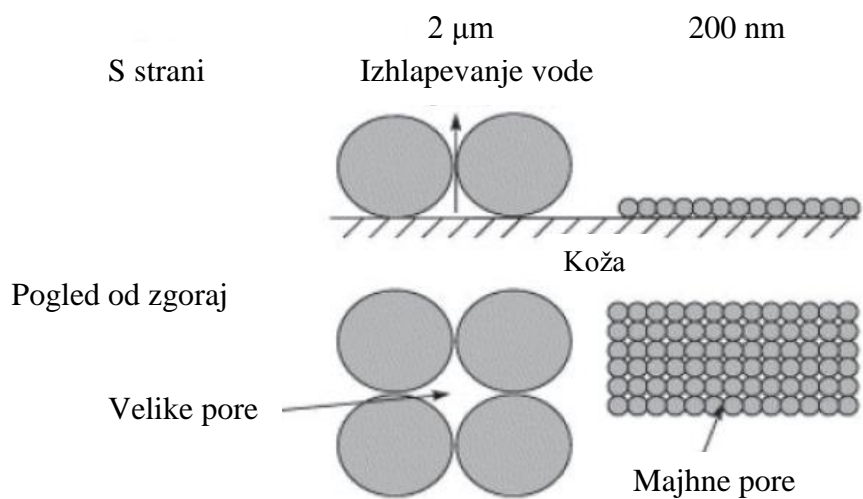
Fotonsko korelacijsko spektroskopijo (PCS) in lasersko difrakcijo (LD) uporabljamo za določanje hidrodinamskega premera delcev. PCS meri fluktuacijo intenzitete sipane svetlobe, ki je posledica Brownovega gibanja delcev (naključno gibanje delcev zaradi

trkov z molekulami disperznega medija). Metoda je primerna za analizo delcev v velikosti od nekaj nm do 3  $\mu\text{m}$ . Večje delce lahko zaznamo z LD. Manjši, kot je delec, večji je kot sipanja in nižja je intenziteta sipanja odbite svetlobe. Manjši kot sipanja in visoka intenziteta sipanja nakazujeta na delec z večjim premerom. Naprava nam po koncu meritev poda hidrodinamski premer in polidisperzni indeks (PDI), ki je ocena širine porazdelitve velikosti delcev. Če je njegova vrednost blizu 0, je vzorec monodisperzen, večja, kot je raznolikost delcev v vzorcu, bližje 1 se giblje vrednost PDI (25, 26). S pomočjo zeta potenciala (ZP) lahko določimo stabilnost elektrostatsko stabiliziranega disperznega sistema. Večji, kot je naboj delcev, večje je elektrostatsko odbijanje med delci, kar poveča fizikalno stabilnost disperzije. Če je ZP večji od  $\pm 30$  mV, je disperzni sistem stabilen (27).

Diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC) uporabljamo za vrednotenje stopnje kristalnosti lipidov in določanje njihovih polimorfnih modifikacij. Metoda temelji na dejstvu, da imajo različne lipidne polimorfne modifikacije različna tališča. Z DSC lahko vrednotimo tudi kristalnost KAS v SLN. Morfološke lastnosti SLN lahko opazujemo z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) (25).

### **1.3.3 Uporaba SLN v kozmetičnih izdelkih**

Zaradi pozitivnih lastnosti SLN na koži se njihova uporaba v kozmetičnih izdelkih povečuje. Sestavljeni so iz komponent, ki jih koža dobro prenaša. SLN nudijo zaščito KAS, ki so občutljive na svetlobo, oksidacijo in hidrolizo. Zaradi svoje velikosti imajo veliko adhezivnost in zmožnost tvorbe okluzivnega filma na koži (slika 5). Ko se SLN razporedijo tesno drug ob drugem, na površini kože tvorijo okluziven film in s tem onemogočijo izhlapevanje vode s površine kože ter tako povečajo hidratacijo kože. Prav tako podaljšajo sproščanje KAS v kožo. SLN zaradi svoje velikosti ne prehajajo skozi nepoškodovano človeško kožo, lahko pa omogočijo prehod KAS v globlje plasti kože zaradi njihove interakcije z lipidi v koži. Uporabljamo jih tudi v izdelkih za zaščito pred soncem, saj delujejo kot UV-filtri. Večja, kot je kristaliničnost SLN, boljši UV-filtri so SLN. Z njihovo uporabo se izboljšajo tudi senzorične lastnosti kozmetičnih izdelkov, saj po nanosu puščajo gladek in mehak občutek na koži. Delujejo tudi kot lubrikant, saj zaradi svoje oblike omogočajo drsenje po koži (27, 28).



Slika 5: Shema okluzivnega filma na koži, ki ga tvorijo lipidni delci velikosti  $2\ \mu\text{m}$  (levo) in  $200\ \text{nm}$  (desno), prirejeno po (29).

## 2. NAMEN DELA

CoQ<sub>10</sub> je endogeni antioksidant. V telesu je v treh oblikah: ubikinon, semikinon in ubikinol, ki se pretvarjajo ena v drugo. Ubikinol oz. reducirana oblika CoQ<sub>10</sub> je v največji meri odgovorna za antioksidativno delovanje. V epidermisu je kar 10-krat večja količina reduciranega Q<sub>10</sub> kot v dermisu. Zaradi teh lastnosti je CoQ<sub>10</sub> vse bolj priljubljena sestavina kozmetičnih izdelkov za zrelo kožo, saj z leti njegova sinteza v telesu slabi, zato ga je potrebno dodatno vnesti v telo.

V naši diplomski nalogi se bomo osredotočili na pripravo reducirane oblike CoQ<sub>10</sub> iz komercialno dostopne oksidirane oblike CoQ<sub>10</sub> in njegovo stabilizacijo. Reducirano obliko CoQ<sub>10</sub> bomo pripravili z uporabo različnih reducentov, obenem pa bomo spremljali vpliv razmerja reducenta in CoQ<sub>10</sub> ter vpliv različnih medijev. Optimizaciji postopka bo sledila študija stabilnosti pripravljenega reduciranega CoQ<sub>10</sub>, pri čemer bomo ugotavljali vpliv nekaterih dejavnikov, kot so temperatura, medij, koncentracija ter dodatek izbranih antioksidantov. Delež reduciranega in oksidiranega CoQ<sub>10</sub> bomo vrednotili z metodo HPLC, ki jo bomo prilagodili in ustrezno ovrednotili tudi za ugotavljanje vsebnosti obeh oblik CoQ<sub>10</sub> v trdnih lipidnih nanodelcih.

Trdni lipidni nanodelci predstavljajo dostavni sistem za aktivne sestavine tudi v kozmetičnih izdelkih, zato bomo vanje vgradili CoQ<sub>10</sub>. Preden bomo izvedli stabilnostno študijo reduciranega CoQ<sub>10</sub> v trdnih lipidnih nanodelcih, bomo preverili, kako sam postopek priprave vzorca za analizo HPLC vpliva na količino reduciranega CoQ<sub>10</sub>, ki naj bi bil vgrajen v trdnih lipidnih nanodelcih. Tekom priprave so delci in CoQ<sub>10</sub> nekaj časa izpostavljeni visokim temperaturam. Po ovrednotenju vpliva teh dejavnikov bomo izvedli študijo stabilnosti CoQ<sub>10</sub> v trdnih lipidnih nanodelcih.

Izbrali bomo antioksidante, ki najbolje stabilizirajo reduciran CoQ<sub>10</sub> v raztopini, in te kombinacije vgradili v trdne lipidne nanodelce. Vzorce bomo shranjevali pri 4 °C, 25 °C in 40 °C ter v izbranih časovnih točkah vrednotili stabilnost reducirane oblike CoQ<sub>10</sub>. Hkrati bomo s pomočjo naprave Zetasizer Nano ZS spremljali tudi fizikalne lastnosti lipidnih nanodelcev (velikost delcev, ZP, PDI).

### 3. Eksperimentalni del

#### 3.1 Materiali

##### 3.1.1 Reagenti in standardi

- Acetonitril,  $C_2H_3N$ ; Chromasolv, za HPLC, gradient grade;  $M = 41,05$  g/mol (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Butilhidroksitoluen,  $C_{15}H_{24}O$ ,  $M = 220,35$  g/mol (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Brezvodni etanol,  $C_2H_5OH$ ; puriss p.a. Reag. Ph Eur (GramMol, Hrvaška)
- Etanol 96,6 % ,  $C_2H_5OH$ ; pro analysi (GramMol, Hrvaška)
- Gliceril dibehenat (Compritol 888 ATO; Gattefossé, Francija)
- Koencim Q10 (Kaneka Corporation, Japonska)
- L-askorbinska kislina,  $C_6H_8O_6$ ,  $M_r = 176$  g/mol (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- L- glutation reduciran GSH,  $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ ,  $M = 307,32$  g/mol (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Lipojska kislina, reducirana,  $C_8H_{14}O_7S_2$ ,  $M = 208,34$  g/mol (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Metanol,  $CH_3OH$ ; Chromasolv for HPLC  $> 99,9$  % (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- MilliQ voda,  $H_2O$  (Fakulteta za farmacijo)
- Polisorbat 80, polioksietilen-(20)-sorbitanmonooleat (Tween 80; Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Poloksamer 188 (Lutrol<sup>®</sup>F 68; BASF, Nemčija)
- Propilenglikol,  $C_3H_8O_2$ ,  $M = 76,09$  g/mol, (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Tetrahidrofuran,  $C_4H_8O$ ; Chromasolv, za HPLC  $M = 72,1$  g/mol (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Vitamin E,  $C_{29}H_{50}O_2$ ,  $M = 430,72$  g/mol (Fluka analytical, Sigma-Aldrich, Nemčija)
- 6-O-palmitoil-L-askorbinska kislina,  $C_{22}H_{38}O_7$ ,  $M = 414,53$  g/mol (Sigma-Aldrich, Nemčija)

##### 3.1.2 Naprave in pribor

- Zetasizer Nano ZS (PCS naprava) (Malvern, Velika Britanija)
- Polistirenske kivete (Sarstedt AG & Co, Nemčija)

- Kiveta za merjenje ZP, DTS 1061 (Malvern, Velika Britanija)
- Ultrazvočna sonda (Ultrasonic processor Cole Parmer, Velika Britanija)
- Centrifuga, Centrifuge 5415R (Eppendorf, Nemčija)
- OMNI PDH (Kennesaw, ZDA)
- Avtomatske pipete 10–100 µl, 100–1000 µl (Eppendorf, Nemčija)
- Analitska tehtnica Excellence Plus (Mettler Toledo, Švica)
- Hladilnik (LTH, Slovenija)
- Vodna kopel WB3 (Kambič, Slovenija)
- Kuhalnik (Končar, Slovenija)
- Ultrazvočna kadička Sonis (Iskra Pio, Slovenija)
- Parafilm (Bemis NA, ZDA)
- Aluminijska folija
- Staklovina (čase, merilne bučke, merilni valji, čolnički za tehtanje, vialo)
- Sistem za pripravo MilliQ vode A10 Advantage (Millipore Corporation, ZDA)
- Klimatska komora (VC4034 Vötsch Industrietechnik, Nemčija)
- HPLC sistem 1100 series (Agilent Technologies, ZDA)
  - Kvarтерна črpalka
  - Avtomatski vzorčevalnik
  - Termostat za kolono
  - UV-VIS detektor
  - Programska oprema ChemStation
  - Kolona: Luna C18 150×4,6 mm, 5µm s predkolono C18 4×3 mm (Phenomenex, ZDA)

## **3.2 Metode**

### **3.2.1 Analizna metoda**

#### **3.2.1.1 Kromatografski pogoji**

Za vrednotenje CoQ<sub>10</sub> smo uporabili metodo iz druge diplomske naloge (26), ki smo jo naknadno prilagodili. Končni kromatografski pogoji so naslednji:

- Kolona: Luna C18, 150×4,6 mm, 5 µm
- Temperatura kolone: 25 °C

- Mobilna faza: acetonitril/tetrahidrofuran/voda (55/40/5; v/v/v)
- Pretok mobilne faze: 1,5 mL/min
- Valovna dolžina detekcije: 280 nm
- Čas analize: 8,5 min
- Retencijski čas ( $t_R$ ): 6,9 min ( $rQ_{10}$ ), 7,6 min ( $oksQ_{10}$ )

### 3.2.1.2 Postopek priprave vzorca SLN za analizo

Vsebnost  $CoQ_{10}$  v disperziji SLN smo sprva izvajali po že znanem postopku, opisanem v drugi diplomski nalogi (26).

#### 3.2.1.2.1 Osnovni postopek

V 2-mL bučko smo odpipetirali 100  $\mu$ L disperzije SLN in dopolnili do oznake z mobilno fazo. Bučko smo zatesnili s parafilmom, da bi preprečili izhlapevanje vzorca, in jo približno 1 min segrevali na vodni kopeli, segreti na 70 °C. Ko so se SLN raztopili v mediju, smo bučko prenesli v ledeno kopel, kjer se je vzorec ohlajal približno 5 min. Vzorce smo nato izpostavili sobni temperaturi. Če je med segrevanjem prišlo do izhlapevanja vzorca, smo vzorec dopolnili z mobilno fazo do oznake. Vsebino bučke smo nato prelili v 2-mL mikrocentrifugirke in jih 15 min centrifugirali pri 20 °C in 13.200 obratih/min. Nato smo odpipetirali 600  $\mu$ L supernatanta, ga prenesli v vialo in analizirali s HPLC.

#### 3.2.1.2.2 Optimizacija postopka

##### Vpliv temperature

Izhajali smo iz osnovne raztopine  $rQ_{10}$  s koncentracijo 1 mg/mL, ki smo jo pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.2.2.2. Naredili smo tri različne vzorce. Vzorce standardne raztopine  $rQ_{10}$  s koncentracijo 1 mg/mL (st.  $rQ_{10}$ ), prazne SLN z naknadnim dodatkom  $rQ_{10}$  s koncentracijo 1 mg/mL (SLN +  $rQ_{10}$ ) in SLN, v katere smo tekom izdelave vgradili  $rQ_{10}$  (SLN 2,5 %  $rQ_{10}$ ).

Vzorce st.  $rQ_{10}$  smo pripravili tako, da smo odpipetirali 200  $\mu$ L standarda  $rQ_{10}$  v 2-mL bučko, dodali 100  $\mu$ L EtOH in jo dopolnili do oznake z mobilno fazo. Pripravili smo 4 paralelke.

Vzorci SLN + rQ<sub>10</sub> smo pripravili tako, da smo odpipetirali 100 µL disperzije praznih SLN v 2-mL bučko, dodali 200 µL standarda rQ<sub>10</sub> s konc. 1 mg/mL, 100 µL EtOH in jo dopolnili do oznake z mobilno fazo. Naredili smo 6 paralelk.

Predhodno smo pripravili disperzijo SLN z rQ<sub>10</sub> po postopku, opisanem v poglavju 3.2.2.2. V 2-ml bučko smo odpipetirali 100 µL tako pripravljene disperzije SLN z rQ<sub>10</sub>, dodali 300 µL EtOH in dopolnili do oznake z mobilno fazo. Pripravili smo 6 paralelk vzorcev SLN 2,5 % rQ<sub>10</sub>.

Vzorci za analizo s HPLC smo pripravili po osnovnem postopku: 2 vzorca st. rQ<sub>10</sub> ter po 3 vzorce SLN + rQ<sub>10</sub> in SLN 2,5 % rQ<sub>10</sub> smo segrevali pri 70 °C, 2 vzorca st. rQ<sub>10</sub> ter po 3 vzorce SLN + rQ<sub>10</sub> in SLN 2,5 % rQ<sub>10</sub> pa pri 85 °C. S tem smo preverili vpliv temperature na standard rQ<sub>10</sub>.

#### Vpliv časa izpostavitve

Preučevali smo tudi vpliv časa izpostavitve povišani temperaturi na stabilnost rQ<sub>10</sub>. Odpipetirali smo 200 µL standarda rQ<sub>10</sub> s konc. 1 mg/mL (poglavje 3.2.2.2) in 100 µL EtOH ter ju prenesli v 2-mL bučko, ki smo jo nato dopolnili do oznake z mobilno fazo. Pripravili smo 6 paralelk vzorcev. Bučke smo segrevali na vodni kopeli pri 70 °C in v različnih časovnih točkah (6, 12 in 20 min) odvzeli po 2 bučki. Po centrifugiranju (13.200 obratov/min, 15 min, 20°C) vzorca smo odvzeli 600 µL supernatanta in ga analizirali s HPLC. Na enak način pripravljen standard rQ<sub>10</sub>, ki pa ni bil izpostavljen 70 °C, smo uporabili kot kontrolo za stabilnost rQ<sub>10</sub> v vzorcih.

#### 3.2.1.2.3 Končni postopek priprave vzorca SLN za analizo

V 2-mL bučko smo odpipetirali 100 µL disperzije SLN in dopolnili do oznake z mobilno fazo. Bučko smo zatesnili s parafilmom, da bi preprečili izhlapevanje vzorca, in jo dali na vodno kopel pri 85 °C za približno 30 min. Ko so se SLN raztopili v mediju, smo bučko prenesli v ledeno kopel, kjer se je vzorec ohlajal približno 5 min. Vzorce smo nato izpostavili sobni temperaturi. Če je tekom segrevanja prišlo do izhlapevanja vzorca, smo vzorec dopolnili z mobilno fazo do oznake. Vsebino bučke smo nato prelili v 2-mL



mikrocentrifugirke ter centrifugirali 15 min pri 20 °C in 13.200 obratih/min. Nato smo odpipetirali 600 µL supernatanta, ga prenesli v vialo in analizirali s HPLC.

### 3.2.1.3 Vrednotenje metode HPLC za CoQ<sub>10</sub>

V okviru validacije metode HPLC smo preverili selektivnost, linearnost in ponovljivost metode na rQ<sub>10</sub> in oksQ<sub>10</sub> v raztopini in v SLN.

#### 3.2.1.3.1 Linearnost metode

Če so odzivi v določenem območju premo sorazmerni s koncentracijo analizirane spojine v vzorcu, pomeni, da je metoda linearna. Na podlagi rezultatov dobimo umeritveno premico in korelacijski koeficient ( $r^2$ ). Če je metoda popolnoma linearna, ima korelacijski koeficient vrednost 1 (30). Linearnost metode smo vrednotili na standardu oksQ<sub>10</sub>, standardu rQ<sub>10</sub> in disperziji SLN z dodatkom ali vgrajenim oksQ<sub>10</sub>.

#### Linearnost standarda oksQ<sub>10</sub>

Najprej smo pripravili standard oksQ<sub>10</sub> s koncentracijo 1 mg/mL. V tehtalni čolniček smo zatehtali 5 mg oksQ<sub>10</sub>, ga prenesli v 5-mL bučko in jo dopolnili z EtOH do oznake. Za umeritveno premico smo naredili standarde oksQ<sub>10</sub> z različnimi koncentracijami. V vialo smo odpipetirali 50, 100 in 150 µL vzorca standarda oksQ<sub>10</sub> in dodali mobilno fazo do 1 mL. Tako pripravljene vzorce s koncentracijo 50, 100 in 150 mg/L smo analizirali s HPLC, izrisali umeritveno premico in določili  $r^2$  za standardno raztopino oksQ<sub>10</sub>. Kriterij za linearnost smo postavili na  $r^2 > 0,999$ .

#### Linearnost standarda rQ<sub>10</sub>

Natehtali smo 30 mg oksQ<sub>10</sub> in 150 mg AK, ju kvantitativno prenesli v 5-mL bučko in dopolnili z EtOH do oznake. Bučko smo za en dan postavili na 60 °C in tako pripravili raztopino rQ<sub>10</sub> s koncentracijo 6 mg/mL. Z ustreznim redčenjem smo pripravili raztopine rQ<sub>10</sub> s koncentracijo 300 mg/L, 60 mg/L in 30 mg/L. Vzorce smo nato analizirali in linearnost vrednotili na enak način kot pri standardu oksQ<sub>10</sub>.

#### Linearnost praznih SLN z dodatkom oksQ<sub>10</sub>

Prazne SLN smo naredili po postopku, opisanem v poglavju 3.2.4.1. Nato smo pripravili vzorce s tremi različnimi koncentracijami oksQ<sub>10</sub>. V 2-mL bučke smo odpipetirali po 100 µL disperzije praznih SLN ter v prvo bučko dodali 300 µL standarda oksQ<sub>10</sub> s koncentracijo 1 mg/mL, v drugo bučko 200 µL standarda oksQ<sub>10</sub> in 100 µL EtOH, v tretjo bučko pa 100 µL standarda oksQ<sub>10</sub> in 200 µL EtOH. Vse bučke smo nato dopolnili do 2 mL z mobilno fazo. Vzorce smo pri posamezni koncentraciji pripravili v 3 paralelkah, saj smo preverili tudi ponovljivost postopka priprave vzorcev za analizo s HPLC (postopek opisan v poglavju 3.2.1.2.1). Vzorce smo nato analizirali in linearnost vrednotili na enak način kot pri standardu oksQ<sub>10</sub>.

#### Linearnost SLN s 5% oksQ<sub>10</sub> z naknadnim dodatkom različnih koncentracij oksQ<sub>10</sub>

Sprva smo naredili disperzijo SLN z oksQ<sub>10</sub> po postopku, opisanem v poglavju 3.2.4.2.1. Nato smo odpipetirali 100 µL te disperzije v 2-mL bučko, dodali 60 µL standarda oksQ<sub>10</sub> s koncentracijo 1 mg/mL in 240 µL EtOH ter dopolnili do 2 mL z mobilno fazo. Na enak način smo pripravili še dva vzorca, le da smo dodali 90 µL standarda oksQ<sub>10</sub> in 210 µL EtOH, ter 120 µL standarda oksQ<sub>10</sub> in 180 µL EtOH. Sledila je priprava vzorcev za analizo s HPLC po postopku 3.2.1.2.1 in vrednotenje linearnosti na enak način kot pri standardu oksQ<sub>10</sub>.

#### 3.2.1.3.2 Selektivnost metode

Selektivnost metode je zmožnost razlikovanja oz. ločevanja med posamezni analiti v istem vzorcu. Če je metoda selektivna, lahko torej kljub prisotnosti nečistot, pomožnih snovi ali drugih komponent v vzorcu zanesljivo vrednotimo obravnavan analit (30).

Selektivnost smo vrednotili tako, da smo analizirali vzorec praznih SLN, SLN z dodatkom oksQ<sub>10</sub> in rQ<sub>10</sub> ter standarda oksQ<sub>10</sub> in rQ<sub>10</sub>. Preverjali smo, ali se pri retencijskih časih oksQ<sub>10</sub> in rQ<sub>10</sub> eluirajo komponente SLN.

#### 3.2.1.3.3 Ponovljivost metode

Ponovljivost metode nam pove, kako se posamezne serije meritev enakega vzorca razlikujejo med seboj. Podamo jo kot standardno deviacijo (SD) ali relativno standardno deviacijo (RSD) (30). Vrednotili smo jo pri različnih vzorcih.

Vrednotili smo ponovljivost postopka izdelave standardne raztopine oksQ<sub>10</sub>. Raztopino smo pripravili s tehtanjem 5 mg oksQ<sub>10</sub> v 5-mL bučko in jo dopolnili z EtOH. Vzorce za analizo smo pripravili z redčenjem 100 µL te raztopine z 900 µL EtOH abs. V treh različnih časovnih točkah znotraj treh mesecev smo te vzorce naredili, jih analizirali in tako preverili, ali je metoda priprave standarda ponovljiva.

Pri izdelavi umeritvene premice praznih SLN z dodatkom oksQ<sub>10</sub> (postopek 3.2.1.3.1) smo pri vsaki koncentraciji oksQ<sub>10</sub> (50, 100 in 150 mg/L) naredili po tri paralelke. Na podlagi odzivov smo izračunali SD in RSD.

Ponovljivost postopka priprave vzorca s SLN, ki vsebuje rQ<sub>10</sub>, smo preverili tako, da smo naredili SLN z vgrajenim rQ<sub>10</sub> (3.2.4.2.2) in ga analizirali v treh paralelkah. Na podlagi rezultatov smo izračunali RSD. Kriterij za ponovljivost analizne metode smo postavili RSD < 10 %.

## **3.2.2 Redukcija oksQ<sub>10</sub>**

### **3.2.2.1 Ugotavljanje optimalnih pogojev za redukcijo oksQ<sub>10</sub>**

Preučevali smo vpliv različnih razmerij koncentracij oksQ<sub>10</sub> in reducenta (askorbinska kislina, askorbilpalmitat – AKp) ter vpliv medija na sam potek redukcije. Kot medij smo uporabili koncentrirani etanol (EtOH), absolutni etanol (EtOH abs.) in metanol (MeOH). Uporabili smo masna razmerja oksQ<sub>10</sub> in reducent med 1:1 in 1:10. Preverjali smo tudi potek redukcije pri uporabi večjih masnih koncentracij oksQ<sub>10</sub> in reducenta pri razmerju 1:5.

Vzorce smo pripravili tako, da smo zatehtali ustrezno količino oksQ<sub>10</sub> in reducenta ter ju prenesli v 2-mL merilno bučko, ki smo jo nato dopolnili do oznake z ustreznim topilom (preglednica I). Merilne bučke smo za nekaj minut postavili v ultrazvočno kadičko, da je nastala bistra raztopina. Merilne bučke smo zatesnili s parafilmom in jih shranjevali pri 60 °C. Vzorce smo analizirali takoj po pripravi (ob času 0) ter po enem dnevu in enem tednu, in sicer tako, da smo v vialo odpipetirali 100 µL posameznega vzorca in 900 µL EtOH. Vialo z vzorci po enem dnevu smo zatesnili s parafilmom in jih shranjevali pri 25 °C. Po šestih dneh je sledila ponovna analiza vzorcev iz vial.

Preglednica I: Priprava reducirane oblike Q<sub>10</sub> v različnih medijih pri različnih razmerjih oksQ<sub>10</sub> in reducenta pri 60 °C.

oksQ <sub>10</sub> (mg/mL)	AK (mg/mL)	AKp (mg/mL)	Vrsta topila
1	1	-	EtOH
1	5	-	EtOH
1	-	5	EtOH
1	10	-	EtOH
1	5	-	MeOH
5	25	-	EtOH
5	-	25	EtOH
1	5		EtOH abs.

### 3.2.2.2 Priprava standardne raztopine rQ<sub>10</sub> s koncentracijo 1 mg/mL

Posamezno smo zatehtali 5,0 mg oksQ<sub>10</sub> in 25,0 mg AK in ju kvantitativno prenesli v 5-mL merilno bučko ter dopolnili do oznake z EtOH. Merilno bučko smo zaprli s pokrovčkom, jo zatesnili s parafilmom in jo za nekaj minut dali v ultrazvočno kadičko, da je nastala bistra raztopina. Vzorec smo nato en dan pustili v vodni kopeli s temperaturo 60 °C, da je potekla popolna redukcija oksQ<sub>10</sub>.

## 3.2.3 Stabilnost rQ<sub>10</sub> v raztopinah

### 3.2.3.1 Priprava vzorcev za vrednotenje stabilnosti rQ<sub>10</sub> pri različnih pogojih

#### 3.2.3.1.1 Vpliv koncentracije

Naredili smo dve paralelki koncentriranega vzorca tako, da smo 1 mL standardne raztopine rQ<sub>10</sub> s konc. 1 mg/mL (postopek 3.2.2.2) odpipetirali v vialo in jo zatesnili s parafilmom. Razredčene vzorce s koncentracijo 0,1 mg/mL smo naredili tako, da smo odpipetirali 100 µL standardne raztopine rQ<sub>10</sub> v vialo in dodali 900 µL EtOH abs. Za vsak vzorec smo naredili 2 paralelki. Eno smo shranjevali pri 25 °C, drugo pri 60 °C. Vzorce smo analizirali 0., 1., 2., 5., 14. in 20. dan.

#### 3.2.3.1.2 Vpliv temperature in medija

Pripravili smo dva vzorca z različnim medijem. V vialo smo odpipetirali 100  $\mu\text{L}$  standardne raztopine rQ<sub>10</sub> s konc. 1 mg/mL, in dodali 900  $\mu\text{L}$  EtOH abs. oz. MeOH. Za vsak medij smo naredili po dve paralelki, eno smo shranjevali pri 4 °C, drugo pa pri 25 °C. Vzorce smo analizirali 0., 1., 2., 5., 14. in 20. dan.

#### 3.2.3.2 Priprava raztopine rQ<sub>10</sub> z antioksidanti

Pripravili smo standardne raztopine antioksidantov s koncentracijo 5 mg/L oz. 1 mg/L (Preglednica II). V vialo smo odpipetirali 100  $\mu\text{L}$  standardne raztopine rQ<sub>10</sub> s koncentracijo 1 mg/mL (postopek 3.2.2.2) in dodali 900  $\mu\text{L}$  standardne raztopine antioksidantov. Po pripravi vzorcev smo le-te analizirali ob času 0. Viale smo zatesnili s parafilmom in jih shranili pri 4 °C oz. pri 25 °C. Analizo vzorcev smo ponovili 1., 2., 5., 14. in 20. dan shranjevanja na izbrani temperaturi. Z metodo HPLC smo določili delež rQ<sub>10</sub> in oksQ<sub>10</sub> v vzorcu.

Preglednica II: Sestava raztopin rQ<sub>10</sub> z dodatkom antioksidantov pri izbranih temperaturah shranjevanja.

Koncentracija antioksidanta	Antioksidant	Medij	Temperatura (°C)
<b>1 mg/mL</b>	AK	EtOH abs	4
	AK	EtOH abs	25
	AK	MeOH	4
	AK	MeOH	25
	AKp	EtOH abs	4
	AKp	EtOH abs	25
	vitamin E	EtOH abs	25
	BHT	EtOH abs	25
	propilenglikol	EtOH abs	25
	lipojska kislina	EtOH abs	25
	kvarcetin	EtOH abs	25
	GSH	EtOH 96,6%	25
<b>5 mg/mL</b>	AK	EtOH abs	4
	AK	EtOH abs	25
	AKp	EtOH abs	4
	AKp	EtOH abs	25

AK – askorbinska kislina, AKp – askorbilpalmitat, BHT – butilhidroksitoluen

#### 3.2.3.2.1 Stabilnost glutationa in askorbinske kisline

Zatehtali smo 20 mg AK oz. GSH, ju prenesli vsakega v svojo 2-mL bučko in dopolnili do oznake z Milli-Q vodo. Bučki smo nato segrevali pri 85 °C in ob časih 0, 5, 10, 20 min odvzeli 100 µL vzorca, ga prenesli v vialo ter dodali 900 µL Milli-Q vode. Tako pripravljen vzorec smo nato analizirali s HPLC z analizno metodo, ki jo na Katedri za Biofarmacijo in farmakokinetiko uporabljajo za vrednotenje obeh antioksidantov.

### 3.2.4 Priprava SLN

#### 3.2.4.1 Izdelava praznih SLN

Postopek izdelave praznih SLN smo povzeli po predhodni diplomski nalogi (26). Uporabili smo metodo dispergiranja taline lipidov v vodno fazo stabilizatorja z uporabo ultrazvočne sonde. Za pripravo osnovne raztopine stabilizatorjev smo zatehtali 300 mg polisorbata 80 in 600 mg poloksamera 188, ju prenesli v 100-mL merilno bučko ter jo dopolnili z destilirano vodo. Bučko smo zatesnili s pokrovčkom in pretresali, da sta se stabilizatorja popolnoma raztopila v vodi. Koncentracija poloksamera 188 je bila 6 mg/mL, polisorbata 80 pa 3 mg/mL.

Raztopino stabilizatorjev smo segreli na vodni kopeli s temperaturo 85–90 °C. Nato smo neposredno v centrifugirko natehtali 46,8 mg lipida (Compritol 888) in ga raztalili na vodni kopeli. Raztaljenemu lipidu smo dodali 200 µL EtOH. Ko je EtOH izhlapel, smo dodali 2 mL segrete raztopine stabilizatorjev in pričeli s soniciranjem. Pazili smo, da je bila konica UZ sonde segreta na isto temperaturo kot talina in stabilizator, da se ob stiku lipid ni začel strjevati, kar bi posledično vodilo v nastanek večjih delcev. Sondo smo v zmes potopili približno 1 cm. Sonicirali smo 75 s z amplitudo 30 %. Po končanem soniciranju smo vročo emulzijo zatesnili in postavili v kadičko z ledom, kjer se je ohlajala približno 5 min.

Takoj po izdelavi smo delcem izmerili povprečni premer, PDI in ZP. Te parametre smo vrednotili tudi 7., 14. in 28. dan, medtem, ko smo vzorce shranjevali pri 4 °C, 25 °C in 40 °C.

### 3.2.4.2 Izdelava SLN s CoQ<sub>10</sub>

Postopek izdelave je bil enak kot pri praznih SLN, le da smo dodali 200 µL ustrezne raztopine CoQ<sub>10</sub>. Po izdelavi smo delcem izmerili povprečni premer, PDI in ZP.

#### 3.2.4.2.1 Z oksidirano obliko CoQ<sub>10</sub>

Naredili smo EtOH raztopino z oksQ<sub>10</sub>. V mikrocentrifugirko smo zatehtali 6 mg oksQ<sub>10</sub> in dodali 1 mL EtOH.

200 µL te raztopine smo nato vgradili v SLN. Naredili smo 3 paralelke istega vzorca.

#### 3.2.4.2.2 Z reducirano obliko CoQ<sub>10</sub>

200 µL standardne raztopine rQ<sub>10</sub> (postopek 3.2.2.2) smo dodali med izdelavo SLN. Naredili smo 3 paralelke istega vzorca.

#### 3.2.4.2.3 Z reducirano obliko Q<sub>10</sub> in antioksidanti

Zaradi hidrofilne narave AK in GSH smo ju raztopili v osnovni raztopini stabilizatorjev. Stabilizator z AK smo naredili tako, da smo v tehtalni čolniček zatehtali 30 mg AK in jo prenesli v 10-mL merilno bučko, ki smo jo dopolnili do oznake z osnovno raztopino stabilizatorjev. Po enakem postopku smo naredili raztopino stabilizatorjev z GSH, le da smo zatehtali 75 mg GSH in ga prenesli v 25-mL merilno bučko. Staljenemu lipidu smo dodali 200 µL standardne raztopine rQ<sub>10</sub> in 2 mL pripravljene raztopine stabilizatorjev z antioksidanti. Naredili smo 3 paralelke istega vzorca z AK in 9 paralelk istega vzorca z GSH.

#### 3.2.4.2.4 Z askorbinsko kislino

Pripravili smo osnovno raztopino z AK. V mikrocentrifugirko smo zatehtali 30 mg AK in dodali 1 mL EtOH. Mikrocentrifugirko smo dali v ultrazvočno kadičko za toliko časa, da se je AK popolnoma raztopila. 200 µL te raztopine smo dodali med izdelavo SLN. Naredili smo 3 paralelke istega vzorca.



### 3.2.4.3 Ugotavljanje optimalnih pogojev za izdelavo SLN s hidrofilnimi antioksidanti

Uporabili smo vse tri paralelke vzorcev SLN z AK, narejenih po postopku 3.2.4.2.4. Vzorce smo izpostavili različnim pogojem, opisanim v Preglednici III, z namenom zmanjšanja velikosti delcev. Po izdelavi SLN smo izmerili povprečni premer in PDI ter na podlagi rezultatov spremljali, kako različni postopki za zmanjševanje velikosti delcev vplivajo na povprečno velikost.

Preglednica III: Postopki zmanjševanja delcev v vzorcih SLN z AK

Vzorec	Postopek
1	centrifuga; 3500 obratov/min; 10 min
2	OMNI homogenizator; 20000 obratov/min; 2,5 min
3	soniciranje z UZ sondo; 2,5 min

#### 3.2.4.3.1 Optimalni postopek priprave SLN z rQ<sub>10</sub>

SLN z rQ<sub>10</sub> smo izdelali tako, da smo v mikrocentrifugirko natehtali 46,8 mg lipida in ga raztalili na vodni kopeli s temperaturo 85–90 °C. Na vodni kopeli smo segreli tudi raztopino stabilizatorjev. Talini lipida smo dodali 200 µL pripravljene raztopine rQ<sub>10</sub> in počakali, da EtOH izhlapi. Nato smo dodali 2 mL raztopine stabilizatorjev. Nastalo emulzijo smo sonicirali 3 min z amplitudo 30 %. Dobljeno emulzijo smo 5 min hladili v kadički z ledom, da se je lipid strdil in nastali so SLN z vgrajenim rQ<sub>10</sub>.

#### 3.2.4.4 Vrednotenje fizikalnih lastnosti SLN

Pripravljenim vzorcem SLN smo s pomočjo meritev z napravo Zetasizer Nano ZS izmerili povprečni premer, PDI in ZP.

V kiveto smo odpipetirali približno 1 mL raztopine stabilizatorja, ki je služil kot disperzni medij za SLN, in dodali 3 kapljice disperzije SLN. Vzorec smo dobro premešali, kiveto zatesnili s pokrovčkom in vstavili v Zetasizer Nano ZS ter tako izmerili povprečni premer in PDI delcev. Po končani meritvi smo del vzorca s pomočjo 2-mL brizge prenesli v kiveto za merjenje ZP. Te fizikalne parametre smo spremljali v različnih časovnih točkah in tako spremljali fizikalno stabilnost pripravljenih disperzij SLN.

Pogoji meritev (povprečni premer, PDI) (26):

- Temperatura: 25 °C
- Viskoznost disperznega medija:  $\eta = 0,8872$  mPas (voda)
- Lomni količnik disperznega medija:  $RI = 1,330$  (voda)
- Valovna dolžina laserske svetlobe (He-Ne laser, »rdeči laser«):  $\lambda = 633$  nm
- Kot merjenja: 173 °
- Kiveta: DTS0012
- Število meritev: 3

Pogoji meritev (ZP) (26):

- Temperatura: 25 °C
- Viskoznost disperznega medija:  $\eta = 0,8872$  mPas (voda)
- Lomni količnik disperznega medija:  $RI = 1,330$  (voda)
- Dielektrična konstanta disperznega medija:  $\epsilon = 78,5$  (voda)
- Model: Smoluchowski
- Celica: DTS 1061, kapilarna celica
- Število meritev: 3

### 3.2.5 Stabilnostna študija SLN z vgrajenim rQ<sub>10</sub>

Najprej smo pripravili standardno raztopino rQ<sub>10</sub> (poglavje v 3.2.2.2), ki smo jo uporabili pri izdelavi SLN. Naredili smo tri različne SLN z rQ<sub>10</sub>: 1. brez dodatka antioksidantov, 2. z dodatkom GSH in 3. z dodatkom AK. Posamezne paralelke SLN smo najprej združili, da smo dobili homogen vzorec in jih nato razdelili v alikvote po 1,5 mL v mikrocentrifugirke. Takoj po izdelavi smo vrednotili fizikalne lastnosti delcev (povprečni premer, PDI in ZP) in po postopku 3.2.1.2.3 pripravili vzorce za analizo s HPLC. Po analizi smo vse mikrocentrifugirke zaprli in zatesnili s parafilmom ter jih shranjevali pri treh različnih pogojih shranjevanja (Preglednica IV). V določenih časovnih točkah (7, 14 in 21 dni) smo vzorce ponovno vrednotili po enakem postopku kot na dan priprave.

Preglednica IV: Število paralelek različnih SLN z vgrajenim rQ<sub>10</sub> pri različnih pogojih shranjevanja

	4 °C	25 °C	40 °C
<b>SLN rQ<sub>10</sub></b>		3	
<b>SLN rQ<sub>10</sub> + AK</b>		3	
<b>SLN rQ<sub>10</sub> + GSH</b>	3	3	3

## **4. Rezultati in razprava**

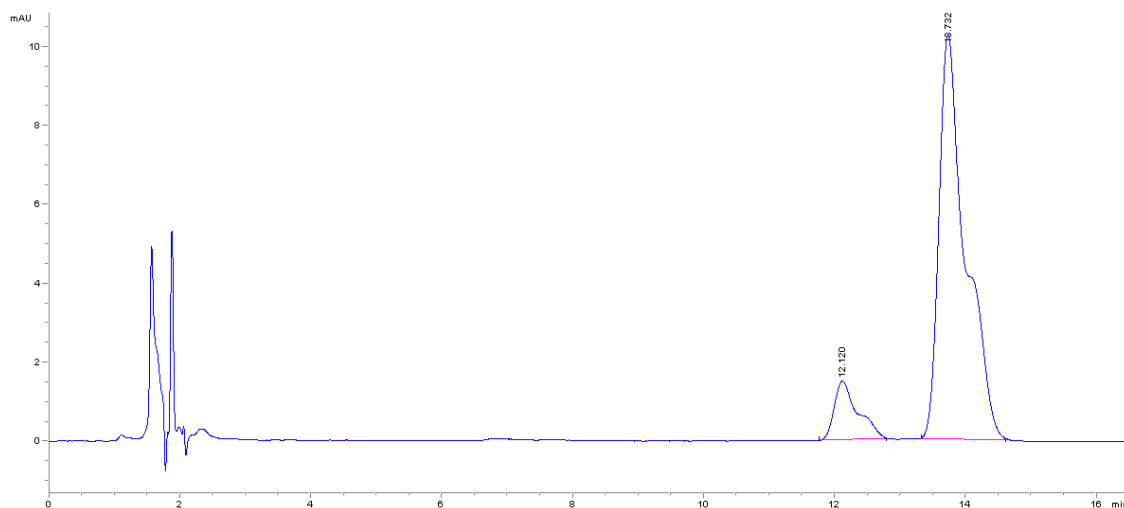
### **4.1 Analizna metoda**

Za vrednotenje CoQ<sub>10</sub> v SLN smo uporabili predhodno razvito metodo, ki smo jo prilagodili našim potrebam (26). Zaradi sprememb analizne metode smo preverili nekatere validacijske parametre in s tem ovrednotili metodo. Pri vsaki spremembi v kromatografskih pogojih ali v postopku priprave vzorca moramo metodo ponovno ovrednotiti in s tem potrditi, da je metoda primerna za vrednotenje izbrane spojine, ter s tem zagotoviti zanesljivost in točnost rezultatov. Smernice za vrednotenje metode najdemo v farmakopeji in v smernicah Mednarodne konference o harmonizaciji za validacijo analiznih metod (30).

#### **4.1.1 Prilagoditev analizne metode**

##### **4.1.1.1 Sprememba kromatografskih pogojev**

Za analizo vzorcev, ki vsebujejo CoQ<sub>10</sub>, smo najprej preizkusili kromatografske pogoje in kolono Synergi Hydro, C18, ki so jo pri vrednotenju CoQ<sub>10</sub> v nanodelcih uporabili v prejšnjih diplomah (26, 31). Oksidirana in reducirana oblika CoQ<sub>10</sub> se med seboj ločita, pri čemer je bil retencijski čas reducirane oblike 12,1 min; oksidirane oblike pa 13,7 min, (slika 6). Zaradi popačenosti kromatografskih vrhov smo preizkusili drugo ekvivalentno kolono enakih dimenzij (Luna C18). S to kolono smo uspeli dobiti simetrične kromatografske vrhove, hkrati pa se je občutno skrajšal tudi čas analize. Obe obliki CoQ<sub>10</sub> se med seboj ustrezno ločita, oksidirana oblika se eluiru pri 7,6 min, reducirana oblika pa pri 6,9 min (slika 7). Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da pri nadaljnjem delu uporabljamo kolono Luna C18.



Slika 6: Kromatogram zmesi reducirane ( $t_R = 12,1$  min) in oksidirane oblike ( $t_R = 13,7$  min) CoQ<sub>10</sub> na koloni Synergi Hydro, C18, 250×4,6 mm.



Slika 7: Kromatogram zmesi reducirane ( $t_R = 6,9$  min) in oksidirane oblike ( $t_R = 7,6$  min) CoQ<sub>10</sub> na koloni Luna C18, 150×4,6 mm.

#### 4.1.1.2 Sprememba postopka priprave vzorca SLN za analizo

Za vrednotenje vsebnosti CoQ<sub>10</sub> v disperziji SLN smo prevzeli postopek, ki so ga uporabljali že v prejšnji diplomski nalogi (26). V navedenem postopku priprave vzorca je nekaj korakov, spremembe katerih bi lahko vplivale na rezultat analize oz. končno vsebnosti CoQ<sub>10</sub> v SLN. Zato smo preverili, kako na rezultate meritev CoQ<sub>10</sub> vplivajo temperatura priprave vzorca SLN, čas izpostavitve vzorca določeni temperaturi in različna koncentracija CoQ<sub>10</sub>.

V postopku priprave vzorcev za analizo s HPLC je potrebno vzorce izpostaviti povišani temperaturi. V prejšnjih diplomskih nalogah so vzorce segrevali pri 70 °C. Pri pripravi disperzije SLN se lipid segreje na 85–90 °C, zato smo preizkusili, ali bi višja temperatura – tj. 85 °C pri pripravi vzorca lahko vplivala na stabilnost rQ<sub>10</sub> oziroma na njegovo pretvorbo v oksQ<sub>10</sub> (po postopku, opisanem v poglavju 3.2.1.2.2).

Najprej smo preverili vpliv temperature pri standardni raztopini rQ<sub>10</sub>. Pripravljeno raztopino smo izpostavili temperaturi 70 °C in 85 °C. Iz rezultatov (Preglednica V) je razvidno, da sprememba temperature nima vpliva na stabilnost rQ<sub>10</sub>; pri višji temperaturi je bil nastanek oksidirane oblike celo nekoliko manjši.

Ker nas je primarno zanimal vpliv temperature pri postopku priprave vzorca SLN za analizo, smo tudi preverili stabilnost rQ<sub>10</sub> na dveh različnih vzorcih – prazni SLN z naknadnim dodatkom rQ<sub>10</sub> in SLN z vgrajenim rQ<sub>10</sub>. V obeh primerih smo opazili, da je še vedno prevladujoč rQ<sub>10</sub>, le manjši del se je pretvoril v oksidirano obliko. Delež rQ<sub>10</sub> in oksQ<sub>10</sub> v teh vzorcih pri obeh temperaturah (70 °C in 85 °C) je tako kot pri raztopini rQ<sub>10</sub> med seboj primerljiv, torej lahko zaključimo, da temperatura med samim postopkom izdelave disperzije SLN z rQ<sub>10</sub> in pripravo vzorca za analizo nima vpliva na stabilnost rQ<sub>10</sub>. Pri vzorcu z vgrajenim rQ<sub>10</sub> je bilo nastale oksidirane oblike celo manj pri 85 °C.

Na osnovi teh rezultatov smo se odločili, da bomo pri izdelavi SLN z vgrajeno rQ<sub>10</sub> in pri pripravi vzorcev za analizo uporabili temperaturo 85 °C. Hkrati se je z izbrano povišano temperaturo skrajšal tudi čas samega postopka priprave vzorca.

Preglednica V: Vpliv temperature na stabilnost  $rQ_{10}$  pri standardu  $rQ_{10}$ , pri vzorcu SLN, ki smo mu naknadno dodali  $rQ_{10}$ , ter vzorcu SLN z vgrajenim  $rQ_{10}$ . Rezultati so podani kot površine pod kromatografskima vrhovoma reducirane in oksidirane oblike  $CoQ_{10}$ .

	$rQ_{10}$	oks $Q_{10}$
<b>st. <math>rQ_{10}</math> 70 °C</b>	187,7	22,8
<b>st. <math>rQ_{10}</math> 85 °C</b>	179,4	13,6
<b>SLN + <math>rQ_{10}</math> 70 °C</b>	184,7	25,1
<b>SLN + <math>rQ_{10}</math> 85 °C</b>	181,9	31,7
<b>SLN 2,5 % <math>rQ_{10}</math> 70 °C</b>	41,0	12,2
<b>SLN 2,5 % <math>rQ_{10}</math> 85 °C</b>	40,0	7,6

V nadaljevanju smo preverili vpliv časa izpostavitve vzorca povišani temperaturi na stabilnost  $rQ_{10}$  (Preglednica VI). Opazili smo, da ni značilnih sprememb pri različnih časih izpostavitve. Odzivi oksidirane in reducirane oblike  $CoQ_{10}$  so namreč znotraj eksperimentalne napake in so tudi primerljivi z začetnim vzorcem, ki ni bil izpostavljen povišani temperaturi. Zaključimo lahko, da  $rQ_{10}$  v vzorcih tekom priprave za analizo zaradi daljšega časa izpostavitve povišani temperaturi ne izgubimo.

Preglednica VI: Vpliv časa izpostavitve povišani temperaturi (70 °C) na stabilnost  $rQ_{10}$ . Rezultati so podani kot površine pod kromatografskima vrhovoma reducirane in oksidirane oblike  $CoQ_{10}$ .

	$rQ_{10}$	oks $Q_{10}$
<b><math>rQ_{10}</math> začetni vzorec</b>	224,7	17,6
<b><math>rQ_{10}</math> 70 °C 6 min</b>	215,2	13,4
<b><math>rQ_{10}</math> 70 °C 12 min</b>	217,3	19,0
<b><math>rQ_{10}</math> 70 °C 20 min</b>	220,9	19,0

#### **4.1.2 Ovrednotenje metode**

Zaradi narejenih sprememb pri prevzeti analizni metodi smo ponovno ovrednotili nekatere validacijske parametre modificirane metode. Vrednotili smo raztopine standardov obeh oblik CoQ<sub>10</sub> in disperzije SLN z dodatkom tako reducirane kot tudi oksidirane oblike CoQ<sub>10</sub>.

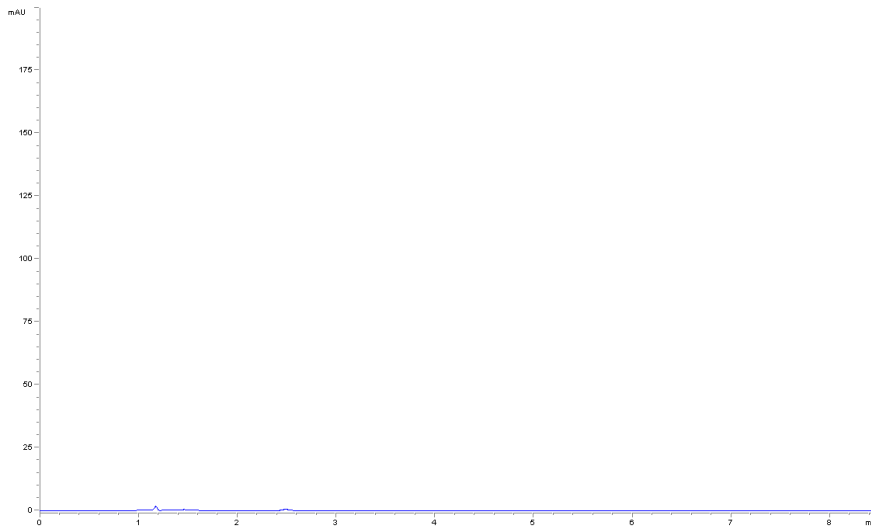
##### **4.1.2.1 Oksidiran CoQ<sub>10</sub>**

Pripravili smo raztopine standarda oksQ<sub>10</sub> s koncentracijo 50, 100 in 150 mg/L, vzorce analizirali in na osnovi odzivov izdelali umeritveno premico. Na podlagi determinacijskega koeficienta, ki je znašal 0,9999, smo potrdili linearnost naše metode.

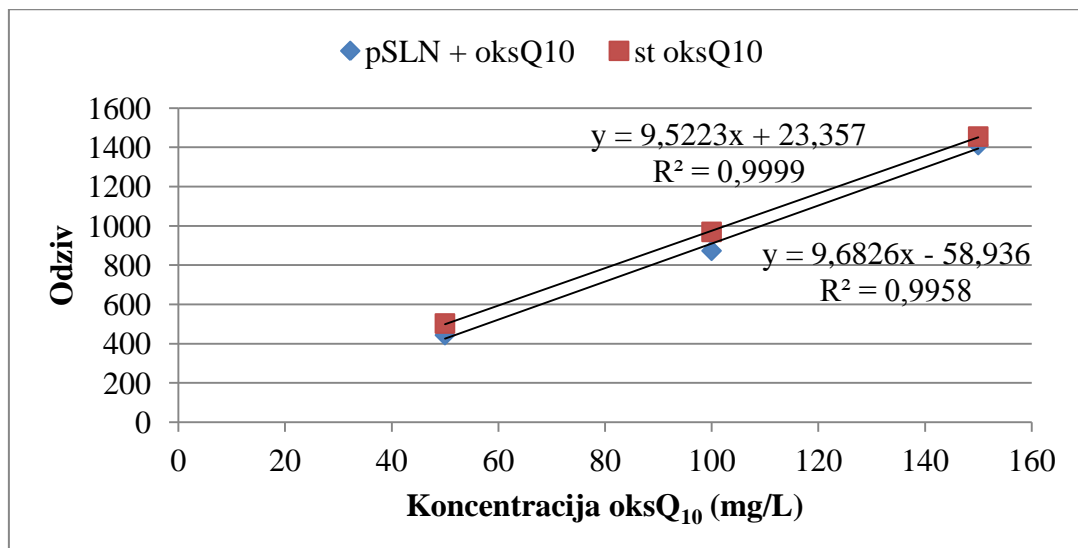
Po vrednotenju analizne metode na standardu oksQ<sub>10</sub> smo linearnost in ponovljivost preverili na disperzijah SLN z dodatkom različnih koncentracij oksQ<sub>10</sub>, da bi se prepričali o ustreznosti naše metode za ugotavljanje vsebnosti CoQ<sub>10</sub> v disperziji SLN.

V prvem sklopu smo disperziji praznih SLN dodali različne koncentracije oksQ<sub>10</sub>. Da bi preverili vpliv sestavin SLN v disperziji, smo primerjalno analizirali tudi standarde na enakih koncentracijskih nivojih. Pri analizi disperzije praznih SLN brez dodatka oksQ<sub>10</sub> v kromatogramu ni bilo kromatografskih vrhov pri retencijskih časih rQ<sub>10</sub> in oksQ<sub>10</sub>, kar pomeni, da je analizna metoda primerna za vrednotenje oksidirane in reducirane oblike CoQ<sub>10</sub>, saj druge komponente iz SLN delcev ne motijo naše analize, torej je metoda selektivna (Slika 8). Dokazali smo linearnost metode, saj se je odziv premo sorazmerno povečeval s naraščajočo koncentracijo oksQ<sub>10</sub> (Slika 9). Odzivi oksQ<sub>10</sub> v obogatenih praznih SLN so bili primerljivi z odzivi standardov pri posameznih koncentracijah. Na podlagi tega sklepamo, da postopek, s katerim pripravimo vzorce SLN z oksCoQ<sub>10</sub>, ne vpliva na analizo oksidirane oblike CoQ<sub>10</sub>.



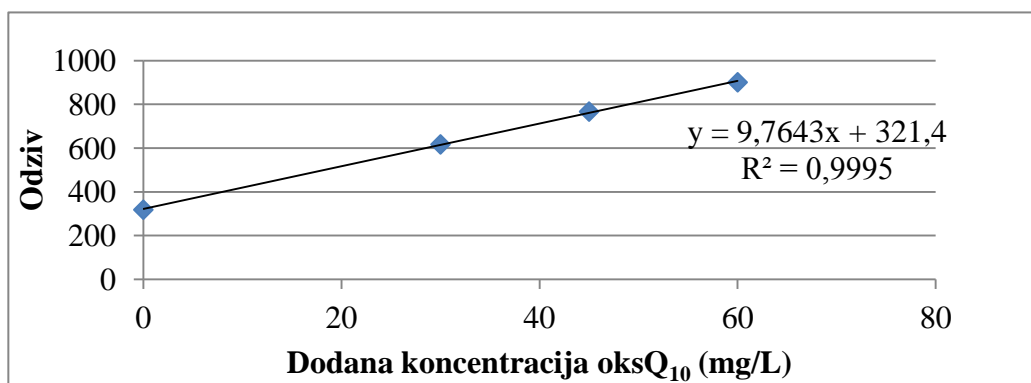


Slika 8: Kromatogram praznih SLN



Slika 9: Umeritvena premica raztopin standardov oksQ<sub>10</sub> (rdeča) in umeritvena premica vzorcev praznih SLN, ki smo jim naknadno dodali različne koncentracije oksQ<sub>10</sub> (modra).

Pripravili smo tudi vzorce disperzije SLN s 5 % oksQ<sub>10</sub>, ki smo jim naknadno dodali različno koncentracijo raztopine oksQ<sub>10</sub> (postopek opisan v poglavju 3.2.4.2.2). S tem smo preverili, ali morda različna vsebnost CoQ<sub>10</sub> vpliva na rezultat vrednotenja CoQ<sub>10</sub> v vzorcu. Dokazali smo, da je metoda primerna, saj zagotavlja, da je v določenem območju oz. intervalu odziv premo sorazmeren s koncentracijo CoQ<sub>10</sub> v vzorcu (Slika 10). Visok korelacijski koeficient ( $R^2 = 0,9995$ ) potrjuje, da različna vsebnost CoQ<sub>10</sub> v SLN ne vpliva na postopek priprave vzorca in posledično na rezultat analize.



Slika 10: Umeritvena premica vzorcev SLN s 5 % oksQ<sub>10</sub> z naknadnim dodatkom različnih koncentracij oksQ<sub>10</sub>.

Preverili smo tudi ponovljivost metode. V Preglednici VII so zbrani rezultati analize vzorcev oksQ<sub>10</sub>, ki smo ga pripravili znotraj trimesečnega obdobja, s čimer smo preverili tudi sam postopek priprave vzorca osnovne raztopine oksQ<sub>10</sub>. Metoda se je izkazala kot ponovljiva, saj je RSD znašala 1,38 %, kar je veliko manj od običajno postavljenih kriterijev za vrednotenje analiznih metod (5–15 %).

Preglednica VII: Ponovljivost priprave raztopine standarda oksQ<sub>10</sub> v različnih časovnih točkah

	Odziv oksQ <sub>10</sub>
<b>1. vzorec 13.10.</b>	941,5
<b>2. vzorec 2.11.</b>	961,9
<b>3. vzorec 25.1.</b>	966,2
<b>Pov. vrednost</b>	956,6
<b>SD</b>	13,2
<b>RSD (%)</b>	1,38

Vrednotili smo tudi ponovljivost postopka priprave vzorcev SLN z različnimi koncentracijami oksQ<sub>10</sub>. Pripravili smo po tri paralelke SLN pri treh različnih koncentracijah oksQ<sub>10</sub> in jih ustrezno pripravili za analizo. Izračunali smo povprečno

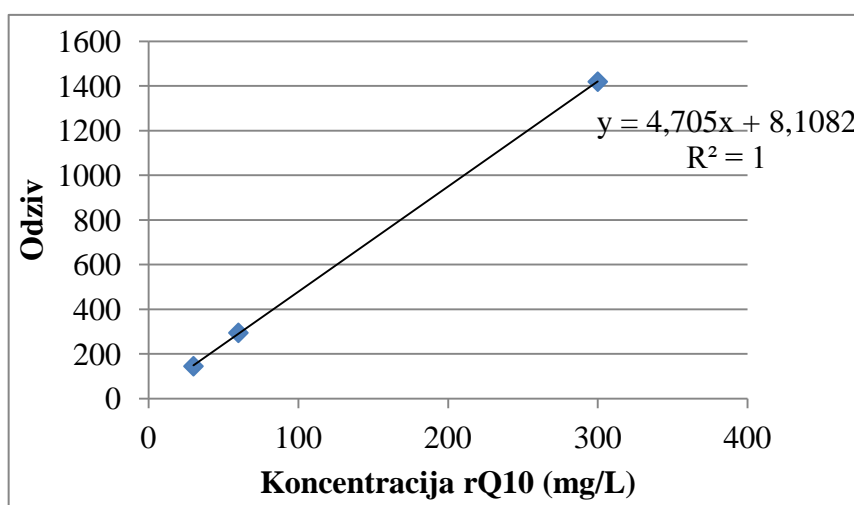
vrednost odzivov oksQ<sub>10</sub> v vzorcih, standardni odmik in RSD (Preglednica VIII). V predhodnih diplomah so za to metodo določili RSD ≤10 %; glede na to, da smo mi imeli boljšo ponovljivost (RSD < 5 % pri vseh koncentracijah), lahko zaključimo, da je postopek priprave vzorcev ustrezno ponovljiv.

Preglednica VIII: Ponovljivost postopka priprave vzorcev SLN, ki vsebujejo različne koncentracije oksQ<sub>10</sub> (n=3).

Koncentracija oksQ <sub>10</sub> (mg/L)	Povprečna vrednost odziva	SD	RSD (%)
50	443,3	20,0	4,51
100	873,1	38,6	4,42
150	1411,6	16,3	1,16

#### 4.1.2.2 Reduciran CoQ<sub>10</sub>

Že predhodno smo potrdili, da med postopkom priprave vzorca ne pride do pretvorbe reducirane v oksidirano obliko CoQ<sub>10</sub> (Preglednica VI). Dodatno pa smo vrednotili tudi linearnost in ponovljivost metode z rQ<sub>10</sub>. Pripravili smo vzorce standarda rQ<sub>10</sub> pri koncentracijah, ki smo jih pričakovali v kasnejši stabilnostni študiji SLN z vgrajenim rQ<sub>10</sub> (30–300 mg/L). Umeritvena premica (Slika 11) potrjuje tudi linearnost metode analize rQ<sub>10</sub>.



Slika 11: Umeritvena premica raztopine standardov rQ<sub>10</sub>.

Zaradi načrtovanja nadaljnje študije smo preverili tudi ponovljivost postopka priprave vzorca SLN, ki je vseboval  $rQ_{10}$  (Preglednica IX). Na podlagi izračunanega RSD lahko potrdimo, da je metoda ponovljiva tudi pri pripravi vzorcev SLN z  $rQ_{10}$ .

Preglednica IX: Ponovljivost postopka priprave vzorcev SLN z vgrajenim  $rQ_{10}$ .

<b>Odziv <math>rQ_{10}</math></b>	
<b>SLN <math>rQ_{10}</math> 1</b>	198,6
<b>SLN <math>rQ_{10}</math> 2</b>	195,4
<b>SLN <math>rQ_{10}</math> 3</b>	188,2
<b>Pov. vrednost</b>	194,1
<b>SD</b>	5,3
<b>RSD</b>	2,74

Na podlagi vseh rezultatov smo zaključili, da je naša analizna metoda linearna, ponovljiva in selektivna za vrednotenje obeh oblik  $CoQ_{10}$  v disperziji SLN.

#### 4.2 Postopek priprave reduciranega $Q_{10}$

V telesu je  $CoQ_{10}$  v treh oblikah in sicer kot ubikinon, semikinon in ubikinol, ki se med seboj pretvarjajo. Ubikinol oz. reduciran  $Q_{10}$  ima močan antioksidativni učinek, zato je bil cilj naše diplomske naloge preučiti stabilnost in vgrajevanje te oblike v SLN in tako omogočiti potencialno uporabo v kozmetičnih izdelkih. Ker standarda  $rQ_{10}$  nismo imeli na razpolago, smo ga iz komercialno dostopnega oks $Q_{10}$  pripravili sami. Izhodišče za ta eksperiment so predstavljali podatki iz predhodne diplome (26), kjer so uporabili AKp kot reducent, vendar niso uspeli pridobiti 100 % reducirane oblike  $CoQ_{10}$ . Zato smo za ta namen preučevali vpliv razmerij med oks $Q_{10}$  in reducenti (nabor smo razširili z AK) ter vpliv temperature in različnih topil, kjer poteka reakcija redukcije oksidirane oblike  $CoQ_{10}$ . Rezultati priprave  $rQ_{10}$  so zbrani v preglednici X.

Ob dodatku reducenta pretvorba oks $Q_{10}$  v  $rQ_{10}$  ni potekla takoj, saj je bila v vzorcu le oksidirana oblika  $CoQ_{10}$ . Le pri vzorcih, kjer je bila AK v prebitku, je nastalo 1 % reducirane oblike v času od priprave pa do začetnih analiz teh vzorcev. Po enem dnevu pri 60 °C je bila pretvorba znatna. V raztopinah z večjo koncentracijo AK (1:5 in 1:10) je

prišlo do popolne pretvorbe v rQ<sub>10</sub>. Pri razmerju med oksQ<sub>10</sub> in AK 1:1 je po enem dnevu nastalo le 19 % rQ<sub>10</sub>, po 7 dneh pa se je reducirana oblika pretvorila nazaj v oksidirano obliko. Na podlagi tega sklepamo, da je za popolno pretvorbo potrebno ustrezno masno razmerje in da je za uspešnost pretvorbe pomembno, da je masna koncentracija AK višja od masne koncentracije oksQ<sub>10</sub>.

Preglednica X: Priprava reducirane oblike CoQ<sub>10</sub> v različnih medijih pri različnih razmerjih oksQ<sub>10</sub> in reducenta ter pri različnih temperaturnih pogojih. Uspešnost pretvorbe je podana kot razmerje med reducirano in oksidirano obliko CoQ<sub>10</sub>.

	Ob času 0		1 dan pri 60 °C		7 dni pri 60 °C		1 dan pri 60 °C in nato 6 dni pri 25 °C	
	rQ <sub>10</sub>	oksQ <sub>10</sub>	rQ <sub>10</sub>	oksQ <sub>10</sub>	rQ <sub>10</sub>	oksQ <sub>10</sub>	rQ <sub>10</sub>	oksQ <sub>10</sub>
oksQ <sub>10</sub> :AK, 1:1*	0	100	19	81	0	100	12	88
EtOH								
oksQ <sub>10</sub> :AK, 1:5	0	100	100	0	100	0	39	61
EtOH								
oksQ <sub>10</sub> :AKp, 1:5	0	100	96	4	100	0	37	63
EtOH								
oksQ <sub>10</sub> :AK, 1:10	0	100	100	0	100	0	24	76
EtOH								
oksQ <sub>10</sub> :AK, 1:5	0	100	54	46	100	0	31	69
MeOH								
oksQ <sub>10</sub> :AK, 5:25	1	99	100	0	100	0	87	13
EtOH								
oksQ <sub>10</sub> :AKp,5:25	1	99	96	4	100	0	77	23
EtOH								
oksQ <sub>10</sub> :AK, 1:5	0	100	72	28				
EtOH abs.								

AK – askorbinska kislina; AKp – askorbilpalmitat; \* – masno razmerje, izraženo v mg

AK je boljši reducent, saj se je z njo oksidirana oblika popolnoma pretvorila v  $rQ_{10}$  že po enem dnevu, v primeru AKp pa je ostalo še 4 % oksidirane oblike, a po 7 dneh je pri uporabi obeh reducentov prišlo do popolne pretvorbe. Zaradi zahtevanih pogojev pri kasnejši stabilnostni študiji smo pripravili tudi vzorce oks $Q_{10}$  z AK in njenim derivatom s petkrat višjo masno koncentracijo (5 mg: 25 mg), vendar z enakim masnim razmerjem 1:5. Potrdili smo, da redukcija poteče na enak način tudi pri višjih masnih koncentracijah oks $Q_{10}$  in reducenta in hkrati ponovno ugotovili, da je AK boljši reducent od njenega derivata AKp. AK je bolj učinkovita na enoto mase. Uporaba višjih masnih koncentracij reducenta je smiselna tudi zaradi same stabilnosti  $rQ_{10}$ . Po šestih dneh izpostavitvi raztopine  $rQ_{10}$  sobni temperaturi je sicer v obeh primerih prišlo do pretvarjanja  $rQ_{10}$  v oks $Q_{10}$ , vendar je pri višjih koncentracijah  $rQ_{10}$  veliko bolj stabilen. Pri višji masni koncentraciji (oks $Q_{10}$ :AK 5:25) je po 6 dneh na 25 °C še vedno 87 %  $rQ_{10}$  glede na vzorec z nižjo masno koncentracijo (oks $Q_{10}$ :AK 1:5), kjer je ostalo le še 39 %  $rQ_{10}$ . Enak trend velja tudi pri uporabi AKp kot reducenta.  $rQ_{10}$  je pri 25 °C stabilen tudi v primeru večjega dodatka reducenta. Tako je v primeru razmerja oks $Q_{10}$ :AK 1:5 po 6 dneh na sobni temperaturi še vedno 39 %  $rQ_{10}$ , medtem kot je pri razmerju 1:1 le še 12 %  $rQ_{10}$ . Iz dobljenih rezultatov je tudi razvidno, da povišana temperatura ob prisotnosti reducenta dejansko stabilizira  $rQ_{10}$  oz. preprečuje pretvorbo  $rQ_{10}$  v oks $Q_{10}$ .

Preverjali smo tudi vpliv medija. Uporabili smo EtOH, EtOH abs. in MeOH. Za najboljši medij se je izkazal EtOH, saj je pretvorba oks $Q_{10}$  do konca potekla po enem dnevu, v EtOH abs. je ostalo še vedno približno četrtnina oks $Q_{10}$ , v MeOH pa približno polovica oks $Q_{10}$ . Odkrili smo, da ima veliko vlogo pri nastajanju reducirane oblike Co $Q_{10}$  uporaba etanola, ki vsebuje manjši delež vode.

V prejšnjih diplomskih nalogah (26, 31) so za redukcijo kot reducent uporabili EtOH abs. in AKp in so za 91 % pretvorbo v  $rQ_{10}$  pri povišani temperaturi potrebovali 6 dni. Mi smo z uporabo EtOH ta čas skrajšali na en dan in ob tem dosegli 100 %  $rQ_{10}$ . Na podlagi rezultatov smo se odločili, da bomo v nadaljevanju pripravljali reducirano obliko  $Q_{10}$  z razmerjem 1:5, oks $Q_{10}$ :AK v EtOH pri 60 °C.

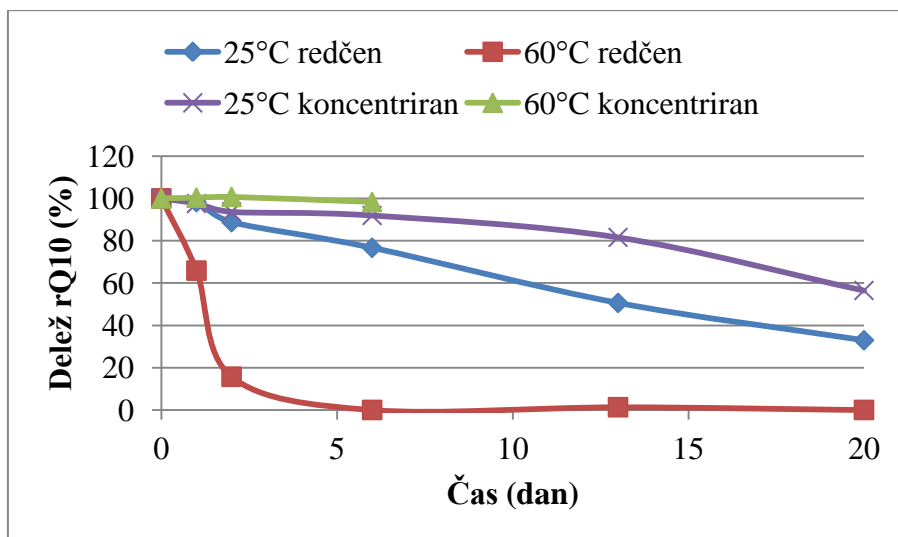
### **4.3 Stabilnost reduciranega Q<sub>10</sub> v raztopinah**

Za rQ<sub>10</sub> je znano, da je izredno nestabilna spojina in se pretvarja v oksQ<sub>10</sub>. Preden smo šli v izvedbo stabilnostne študije rQ<sub>10</sub>, ki je vgrajen v SLN, smo preverili stabilnost samega rQ<sub>10</sub> v raztopinah. V okviru tega smo raziskovali, kako različna koncentracija, topilo, sprememba temperature in dodatek različnih antioksidantov vplivajo na stabilnost rQ<sub>10</sub>.

#### **4.3.1 Vpliv dejavnikov na stabilnost reduciranega Q<sub>10</sub>**

##### **4.3.1.1 Vpliv koncentracije**

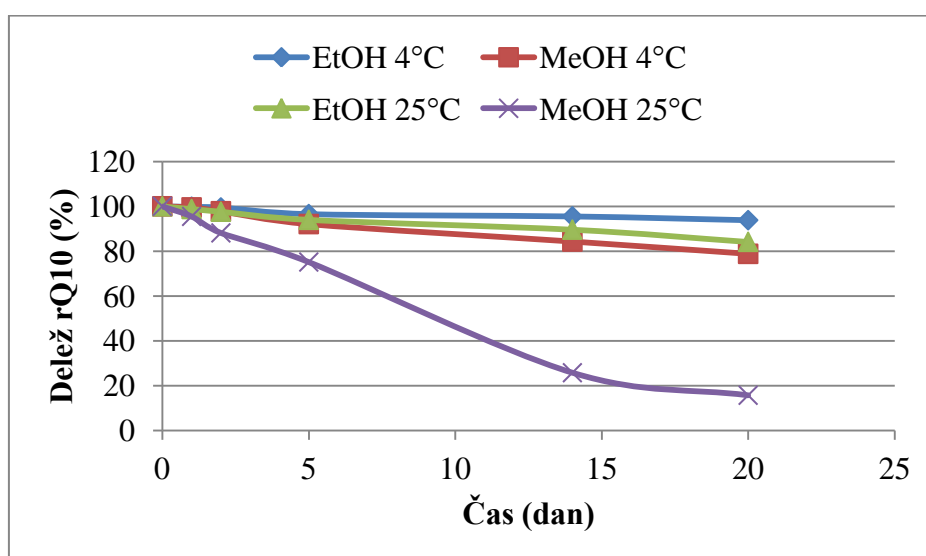
V prejšnjem poglavju smo optimizirali postopek priprave rQ<sub>10</sub>, obenem pa deloma tudi preverjali stabilnost rQ<sub>10</sub>. Ugotovili smo, da je višja koncentracija rQ<sub>10</sub> v raztopini bolj stabilna (Preglednica X). Po 6 dneh na sobni temperaturi je namreč ostalo še 39 % rQ<sub>10</sub> pri koncentraciji 1 mg rQ<sub>10</sub> /5 mL, medtem ko je pri 5 mg rQ<sub>10</sub> /5 mL ostalo še 87 % rQ<sub>10</sub>. V primeru, ko smo kot reducent za pripravo rQ<sub>10</sub> uporabili askorbilpalmitat namesto AK, je bil opazen enak trend, saj je bilo po 6 dneh pri nižji koncentraciji prisotno še 37 %, pri višji koncentraciji pa 77 % rQ<sub>10</sub>. V ločenem poskusu smo ponovno preverili vpliv koncentracije rQ<sub>10</sub> na njegovo stabilnost. Izbrali smo dve koncentraciji 0,1 mg/mL (redčen rQ<sub>10</sub>) in 1 mg/mL (koncentriran rQ<sub>10</sub>) ter spremljali stabilnost pri dveh temperaturah (slika 12). Tudi v tem primeru smo ugotovili, da koncentracija pomembno vpliva na stabilnost rQ<sub>10</sub>. Pri 25 °C se po dveh dneh začne značilno bolj zniževati vsebnost rQ<sub>10</sub> pri nižji koncentraciji. Pri 60 °C pa je vpliv koncentracije še dosti bolj izrazit. Že po 6 dneh je pri nižji koncentraciji prišlo do popolne pretvorbe rQ<sub>10</sub>, medtem ko je v koncentrirani raztopini bilo še vedno blizu 100 % rQ<sub>10</sub>.



Slika 12: Vpliv koncentracije na stabilnost  $rQ_{10}$  v raztopinah pri dveh temperaturah.

#### 4.3.1.2 Vpliv medija

Preverili smo tudi vpliv medija pri dveh različnih temperaturah (Slika 13). Vzorci, ki smo jih shranili v hladilniku pri 4 °C, so se izkazali za bolj stabilne v primerjavi z vzorci enake sestave, ki so bili shranjeni pri sobni temperaturi. V MeOH pri 25 °C se krivulja upada deleža  $rQ_{10}$  bistveno razlikuje od ostalih, saj že po 5 dneh delež  $rQ_{10}$  pade pod 80 %, po 20 dneh pa celo pod 20 %. Pri ostalih vzorcih je vsebnost  $rQ_{10}$  po 20 dneh vsaj še 80 %. V EtOH abs. je tudi pri 4 °C  $rQ_{10}$  bolj stabilen, vendar pri tej temperaturi razlika ni tako očitna. Zaključimo lahko, da je EtOH abs. primernejše topilo za shranjevanje  $rQ_{10}$  kot MeOH.

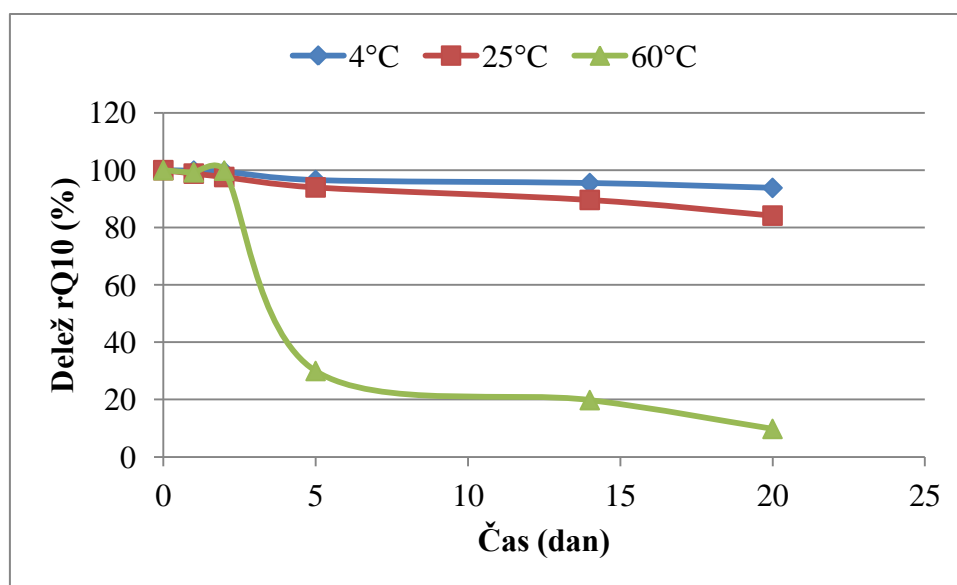


Slika 13: Vpliv medija na stabilnost  $rQ_{10}$  pri dveh temperaturah.



#### 4.3.1.3 Vpliv temperature

Preverili smo, kako temperatura shranjevanja (4 °C, 25 °C in 60 °C) vpliva na stabilnost  $rQ_{10}$ . Kot primerjavo smo uporabili vzorce  $rQ_{10}$  v EtOH abs. (Slika 14). Ugotovili smo, da je vzorec, ki smo ga shranjevali v hladilniku, najbolj stabilen, saj je po 20 dneh vsebnost  $rQ_{10}$  še vedno nad 90 %. Po enakem času je bilo v vzorcu, ki smo ga shranjevali pri sobni temperaturi, okoli 85 % deleža  $rQ_{10}$ , za najmanj stabilno se je izkazalo shranjevanje pri visoki temperaturi, kjer je po 20 dneh preostalo le še okoli 10%  $rQ_{10}$ , medtem ko se je preostali del pretvoril v oks $Q_{10}$ . Stabilnost v vzorcih, kjer smo kot medij uporabili MeOH, je bila pri enakih temperaturah shranjevanja po 20 dneh slabša kot pri vzorcih z EtOH abs. (Slika 13).

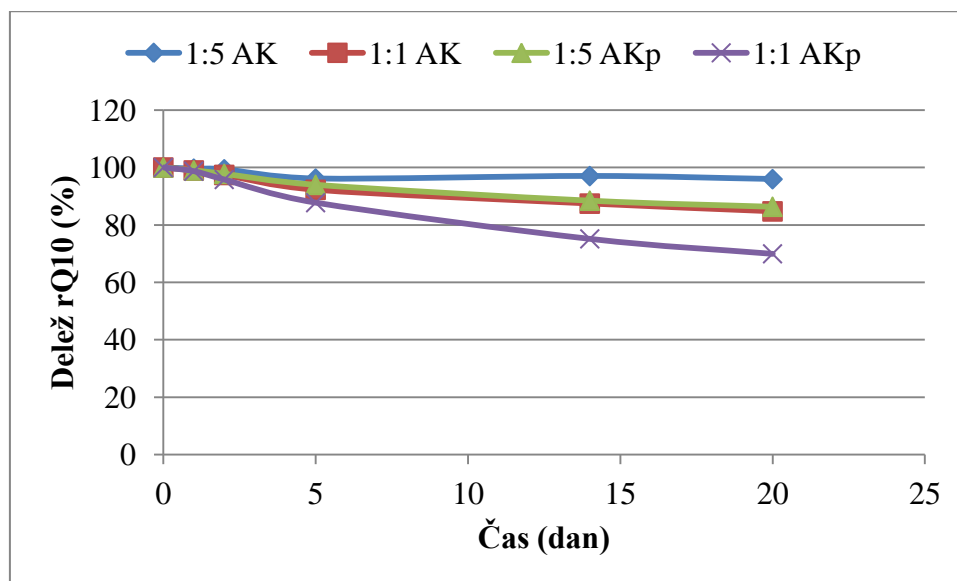


Slika 14: Vpliv temperature na stabilnost  $rQ_{10}$  v etanolni raztopini.

#### 4.3.2 Stabilizacija reducirane oblike $Q_{10}$ z antioksidanti

V nadaljevanju smo želeli povečati stabilnost  $rQ_{10}$ . S tem namenom smo vrednotili različne antioksidante. V prvem delu smo testirali AK in AKp. Predhodno smo pripravili raztopino  $rQ_{10}$  po postopku, opisanem v poglavju 3.2.2.2. Pripravljenemu vzorcu smo nato dodali različne koncentracije izbranih antioksidantov. Vpliv koncentracije AK in njenega derivata oz. masnega razmerja glede na  $rQ_{10}$  pri 25 °C je predstavljen na Sliki 15. Iz grafa je razvidno, da ima razmerje masnih koncentracij (1:1 oz. 1:5) velik vpliv na stabilnost  $rQ_{10}$ .  $rQ_{10}$  je bil bolj stabilen v vzorcih, v katerih je bil 5-krat večji masni delež antioksidanta, ne glede na izbran antioksidant. Zlasti v vzorcu  $rQ_{10}$ :AK = 1:5 je bil  $rQ_{10}$  zelo stabilen, saj ga

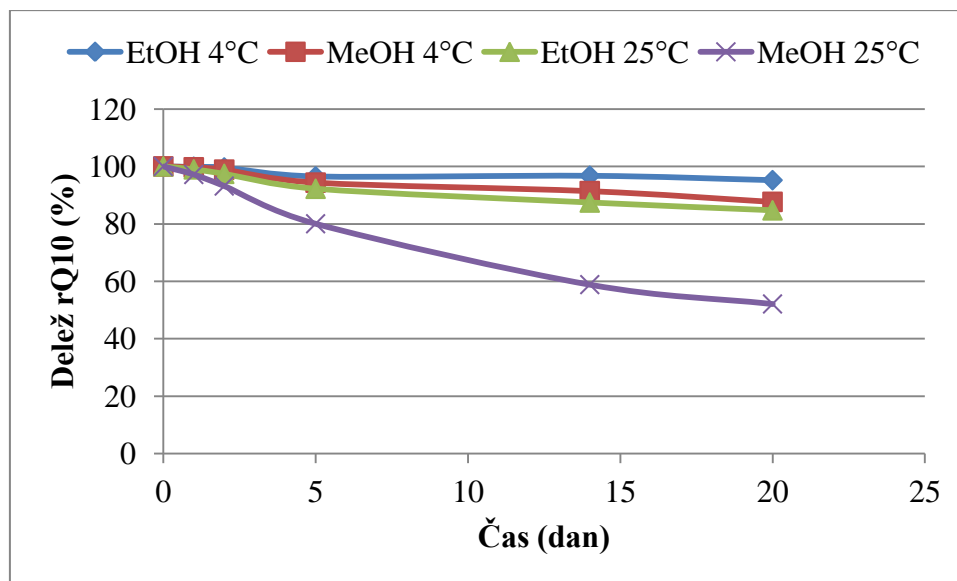
je po 20 dneh ostalo še vedno približno 98 %. Ponovno smo potrdili, da je AK bolj primerna za stabilizacijo reducirane oblike CoQ<sub>10</sub> od AKp.



Slika 15: Vpliv masnega razmerja med rQ<sub>10</sub> in antioksidantom (askorbinska kislina in askorbilpalmitat) na stabilnost rQ<sub>10</sub> v etanolu pri 25 °C.

V nadaljevanju smo preverjali stabilnost rQ<sub>10</sub> ob dodatku AK v razmerju 1:1 pri različnih temperaturah in medijih (Slika 16). Vzorce smo shranjevali 20 dni pri 4 °C ali 25 °C v MeOH in EtOH abs. Vzorci, shranjeni pri 4 °C, so bili stabilnejši od vzorcev, ki so bili izpostavljeni sobni temperaturi. Ugotovili smo, da ima temperatura shranjevanja manjši vpliv na stabilnost rQ<sub>10</sub> kot vrsta medija, saj so bile v slednjem primeru razlike zelo očitne. Iz primerjave vzorcev, shranjenih pri 25 °C, je razvidno, da je bil delež rQ<sub>10</sub> v vzorcu z EtOH abs. še vedno zelo visok, okoli 97 %. V vzorcu z MeOH pa je ostalo rQ<sub>10</sub> le še 58 %. Ti rezultati se skladajo z rezultati, ki smo jih pridobili brez naknadnega dodatka antioksidanta (Slika 14) – rQ<sub>10</sub> je bolj stabilen pri nižji temperaturi in v EtOH abs. Vendar je ob dodatku antioksidanta opazna stabilizacija rQ<sub>10</sub>, še najbolj pri bolj nestabilnih vzorcih. Tako je v metanolni raztopini pri 25 °C po 20 dneh ostalo približno 3-krat več rQ<sub>10</sub> v primeru dodatka antioksidanta (58 %, Slika 16, in 19 %, Slika 13).

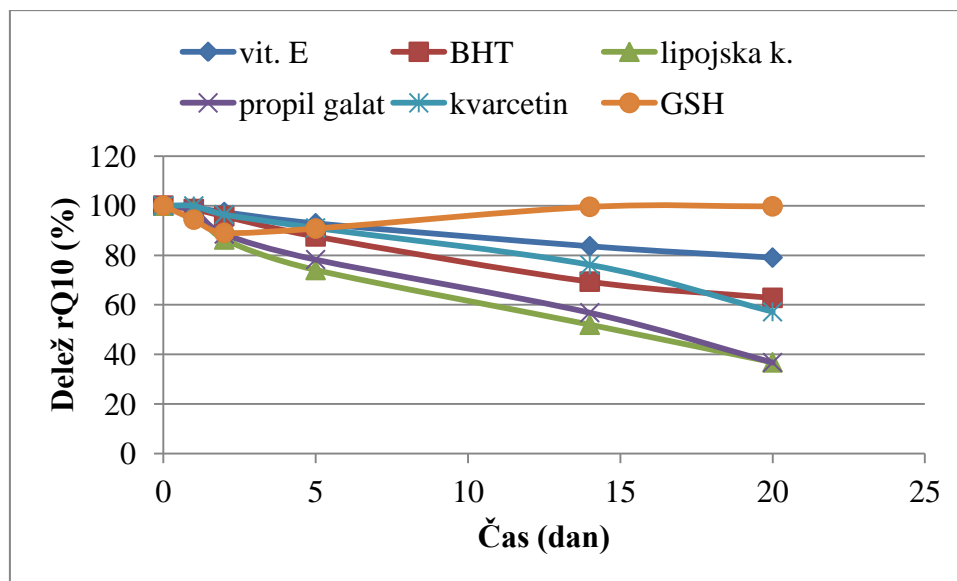
Na podlagi vseh rezultatov proučevanja stabilnosti ob prisotnosti AK in AKp lahko zaključimo, da smo uspeli reducirano obliko CoQ<sub>10</sub> dobro stabilizirati, če smo izbrali masno razmerje med rQ<sub>10</sub> in AK 1:5 v EtOH abs. pri 25 °C, saj je bila vsebnost rQ<sub>10</sub> po dvajsetih dneh še vedno okoli 100 %.



Slika 16: Vpliv temperature in medija na stabilnost  $rQ_{10}$  v raztopini ob dodatku askorbinske kisline v masnem razmerju 1:1.

V drugem delu smo preizkusili antioksidante, koncentracija katerih je bila 1 mg/mL (Slika 17). Kot najboljši antioksidant se je izkazal GSH, saj je bila vsebnost  $rQ_{10}$  po 20 dneh blizu 100 %. V časovnih točkah 2 in 6 dni je bil delež  $rQ_{10}$  nekoliko nižji, kar pa delno pripisujemo eksperimentalni napaki, morda pa je prišlo do delne pretvorbe v oks $Q_{10}$  in potem nazaj v  $rQ_{10}$ . Po 13 dneh je bila vsebnost  $rQ_{10}$  enaka začetni vsebnosti in se je taka ohranila tudi do 20 dne. Pri ostalih antioksidantih pa smo opazili trend padanja koncentracije  $rQ_{10}$  s časom. Po 20 dneh je bil delež  $rQ_{10}$  v vzorcu z vit. E 80 %, podobno učinkovitost delovanja sta pokazala kvarcetin in BHT, saj je bil delež  $rQ_{10}$  v obeh vzorcih okoli 60%. Najslabši stabilizacijski učinek sta imela propilgalat in lipojska kislina, saj je delež  $rQ_{10}$  po 20 dneh padel celo pod 40 %.

Izmed vseh testiranih antioksidantov je  $rQ_{10}$  najbolj stabiliziral GSH, zato smo ga uporabili tudi pri izdelavi SLN z  $rQ_{10}$ .



Slika 17: Stabilnost rQ<sub>10</sub> v etanolu ob dodatku različnih antioksidantov v masnem razmerju 1:1 pri 25 °C.

#### 4.3.3 Stabilnost izbranih antioksidantov pri povišani temperaturi

Za povečanje stabilnosti reduciranega CoQ<sub>10</sub> smo testirali različne antioksidante in izbrali dva najbolj učinkovita. Preden smo jih uporabili pri izdelavi SLN, smo testirali, ali lahko sam postopek izdelave SLN vpliva na stabilnost antioksidanta. Izbrani antioksidanti morajo biti stabilni pri povišani temperaturi, saj so tekom priprave SLN izpostavljeni temperaturi 85 °C. V ta namen smo testirali AK in GSH. Vzorce smo pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.2.3.2.1. Oba antioksidanta sta bila stabilna pri temperaturi 85 °C v vseh časovnih točkah izpostavitve (0, 5, 10, 20 min) (Preglednica XI). S tem testom smo potrdili, da antioksidanta nista občutljiva na povišano temperaturo v časovnem obdobju priprave SLN in posledično obdržita sposobnost stabilizacije rQ<sub>10</sub> v SLN.

Preglednica XI: Stabilnost raztopin askorbinske kisline in glutationa, izraženo glede na začetno vrednost, pri 85 °C

	Askorbinska kislina (%)	Glutation (%)
<b>0 min</b>	100,0	100,0
<b>5 min</b>	103,8	100,1
<b>10 min</b>	97,0	99,7
<b>20 min</b>	97,4	97,4

## 4.4 Priprava SLN

### 4.4.1 Izdelava praznih SLN

Disperzijo praznih SLN smo izdelali po predhodno razvitem postopku (26), a z eno spremembo. V disperzijo lipida in zmesi stabilizatorja smo vključili 200  $\mu\text{L}$  EtOH, da bi se čim bolj približali postopku, ki smo ga potem uporabili za vgrajevanje rQ<sub>10</sub>. Izdelan vzorec SLN smo izpostavili različnim temperaturnim razmeram z namenom opazovanja fizikalne stabilnosti. Vrednotili smo povprečno velikost delcev, polidisperzni indeks in zeta potencial (Preglednica XII).

Velikost delcev je pri izpostavitvi različnim temperaturam znotraj časovnega obdobja enega meseca ostala nespremenjena, prav tako tudi polidisperzni indeks in zeta potencial. Potrdimo lahko, da so prazni SLN fizikalno stabilni pri različnih temperaturah in to je skladno z ugotovitvami iz prejšnjih diplom (26, 31).

Preglednica XII: Fizikalne lastnosti praznih SLN (povprečni premer, polidisperzni indeks in zeta potencial) tekom shranjevanja pri različnih temperaturah.

	0			7 dni			14 dni			28 dni		
	d (nm)	PDI	ZP (mV)	d (nm)	PDI	ZP (mV)	d (nm)	PDI	ZP (mV)	d (nm)	PDI	ZP (mV)
4 °C	190,5	0,39	-24,5	198,3	0,39	-14,1	179,9	0,29	-13,4	178,4	0,37	-14,7
25 °C				172,2	0,37	-13,5	170,6	0,35	-13,2	173,5	0,38	-14,6
40 °C				166,1	0,29	-14,4	194,3	0,43	-13,9	176,5	0,31	-14,7

d – hidrodinamski premer; PDI – polidisperzni indeks; ZP – zeta potencial

### 4.4.2 Izdelava SLN z reducirano obliko CoQ<sub>10</sub> in antioksidanti

SLN z rQ<sub>10</sub> smo izdelali po enakem postopku kot prazne SLN, le da smo tekom izdelave vgradili še rQ<sub>10</sub>. Ker sta bila izbrana antioksidanta vodotopna, smo ju pri izdelavi nanodelcev dodali v raztopino stabilizatorjev. Izdelali smo tri različne disperzije SLN z rQ<sub>10</sub>: 1. brez dodatka antioksidanta, 2. z dodatkom AK in 3. z dodatkom GSH. Neposredno po izdelavi delcev smo preverili njihove fizikalne lastnosti (Preglednica XIII). Velikost je bila v primerjavi s praznimi SLN precej večja, med serijami pa je prišlo do velikih razlik v

povprečni velikosti delcev. Prav tako je bil večji tudi PDI, kar kaže na polidisperzni sistem. ZP praznih SLN je bil okoli -24,5 mV, pri delcih z dodanim rQ<sub>10</sub> in antioksidantom se je le-ta zmanjšal na okoli -1,5 mV, kar nakazuje na fizikalno izredno nestabilen sistem.

Da bi ugotovili, katera komponenta je vplivala na spremenjene fizikalne lastnosti disperzije, smo naredili disperzijo SLN z dodatkom oksidirane oblike CoQ<sub>10</sub> in disperzijo SLN z dodatkom AK. Delci, ki so vsebovali samo oksQ<sub>10</sub>, so se v primerjavi s praznimi SLN le malo povečali, primerljiv je bil tudi PDI. Pri izdelavi disperzije SLN z AK smo staljenemu lipidu dodali etanolno raztopino AK. Ker je AK hidrofilna spojina in je netopna v lipidu, je med samo pripravo SLN kristalizirala. Analiza teh delcev je pokazala velik vpliv AK na fizikalne lastnosti delcev SLN in njihovo stabilnost, saj so bili le-ti primerljivi z delci, ki smo jim dodali rQ<sub>10</sub>. Torej lahko zaključimo, da hidrofilne spojine oz. prisotni antioksidanti vplivajo na velikost delcev in njihovo fizikalno stabilnost.

Preglednica XIII: Fizikalne lastnosti SLN brez in s CoQ<sub>10</sub>.

	<b>D (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>ZP (mV)</b>
<b>prazni</b>	190,5 ± 2,0	0,39 ± 0,01	-24,5 ± 1,3
<b>rQ<sub>10</sub></b>	985,6 ± 162,9	0,63 ± 0,03	-1,8 ± 0,1
<b>rQ<sub>10</sub> + AK</b>	835,3 ± 136,8	0,62 ± 0,07	-1,6 ± 0,3
<b>rQ<sub>10</sub> + GSH</b>	795,2 ± 285,3	0,63 ± 0,14	-1,3 ± 0,2
<b>AK</b>	733,4 ± 125,5	0,60 ± 0,03	-1,9 ± 0,1
<b>oksQ<sub>10</sub></b>	250,5 ± 4,4	0,45 ± 0,07	-12,7 ± 0,2

AK – askorbinska kislina, GSH – glutation

V naslednjem koraku smo preizkusili tri postopke, s katerimi bi potencialno lahko zmanjšali povprečno velikost delcev v disperziji ob nespremenjeni sestavi SLN. Preizkus smo izvedli na izdelani disperziji SLN z AK. Preverili smo vpliv dodatnega centrifugiranja, homogeniziranja in soniciranja. Centrifugiranje je delce povečalo, dodatno homogeniziranje z rotor-stator homogenizatorjem (OMNI) je delce zmanjšalo za 21 %. Najbolj učinkovit način zmanjševanja delcev se je bilo dodatno soniciranje, saj smo uspeli delce zmanjšati za kar 38 %. Na podlagi teh ugotovitev smo se odločili, da bomo pri izdelavi delcev SLN čas soniciranja podaljšali s 75 s na 3 min (Preglednica XIV).

Preglednica XIV: Vpliv različnih postopkov na fizikalne lastnosti SLN

		Pred optimizacijo	Postopek	Po optimizaciji
<b>1. vzorec</b>	d (nm)	600	centrifugiranje	824,8
	PDI	0,591		0,637
<b>2. vzorec</b>	d (nm)	849	homogeniziranj	665,1
	PDI	0,636	e	0,586
<b>3. vzorec</b>	d (nm)	751,2	soniciranje	463,9
	PDI	0,570		0,515

#### 4.5 Stabilnost reduciranega CoQ<sub>10</sub> v SLN

Pripravili smo disperzije SLN z rQ<sub>10</sub> in antioksidanti po postopku, ki smo ga prilagodili z namenom poenotenja in zmanjšanja velikosti delcev. V naprej definiranih časovnih točkah smo spremljali stabilnost rQ<sub>10</sub> v SLN z različno sestavo in pri različnih pogojih ter fizikalno stabilnost SLN. Vzorce SLN z rQ<sub>10</sub> in dodanim GSH smo razdelili v več paralelek in jih shranjevali pri 4 °C, 25 °C in 40 °C, ostale vzorce SLN pa smo shranjevali pri sobni temperaturi (25 °C).

##### 4.5.1. Fizikalna stabilnost SLN

Po pripravi vzorcev smo izmerili njihovo povprečno velikost, PDI in ZP. Kot je razvidno iz Preglednice XV, smo uspeli delce poenotiti na velikost med 500 in 600 nm, kar pomeni, da so bili delci z dodatnim soniciranjem manjši za 200–400 nm. Presenetil nas je ZP, ki je bil zelo nizek (med -1 in -2 mV) in je napovedoval zelo nestabilen sistem. V stabilnih koloidnih sistemih je ZP delcev večji od +30 mV ali manjši od -30 mV (17). Pričakovanja glede nestabilnega sistema so se uresničila, saj so po enem tednu vsi SLN prešli iz nanometriškega v mikrometrsko območje. Zaradi nestabilnosti sistema je bila ponovljivost slabša. Opazili smo tudi veliko sipanje rezultatov med tremi paralelkami istih vzorcev. Pri vzorcih z reduciranim CoQ<sub>10</sub> in vzorcih z reduciranim CoQ<sub>10</sub> in z dodatkom AK se je velikost delcev povečala tudi za 7-krat, medtem ko se je maksimalna velikost pri delcih z reduciranim CoQ<sub>10</sub> z dodatkom GSH v povprečju povečala za 10-krat. ZP in PDI se s časom nista značilno spremenila.

Ugotovili smo, da je izdelan sistem iz fizikalnega vidika izredno nestabilen in bodo v prihodnje potrebne nadaljnje raziskave, kako zmanjšati povprečno velikost delcev v disperziji, povečati ZP in s tem posledično stabilizirati SLN z vgrajenimi hidrofilnimi sestavinami.

Preglednica XV: Fizikalne lastnosti SLN z rQ<sub>10</sub> in dodatkom antioksidantov (povprečni premer, polidisperzni indeks in zeta potencial) tekom shranjevanja pri različnih temperaturah.

	0			7 dni			28 dni		
	d (nm)	PDI	ZP (mV)	d (nm)	PDI	ZP (mV)	d (nm)	PDI	ZP (mV)
rQ <sub>10</sub>	577±9	0,48±0,03	-2,4±0,1	3164 ±326	0,44±0,13	-1,7±0,4	3435	0,56±0,06	-1,6±0,2
rQ <sub>10</sub> + AK	504±13	0,49±0,01	-1,7±0,2	3561±304	0,75±0,16	-1,1±0,0	3510±979	0,44±0,20	-1,4±0,6
rQ <sub>10</sub> + GSH 4 °C	512±4	0,47±0,02	-1,3±0,1	1082±22	0,41±0,05	-1,5±0,0	1229±28	0,49±0,01	-2,1±0,2
rQ <sub>10</sub> + GSH 25 °C				2245±6	0,50±0,03	-1,6±0,0	1573±144	0,46±0,03	-2,4±0,1
rQ <sub>10</sub> + GSH 40 °C				4220±351	0,65±0,00	-1,1±0,0	4274±349	0,67±0,08	-1,3±0,0

AK – askorbinska kislina, GSH – glutation

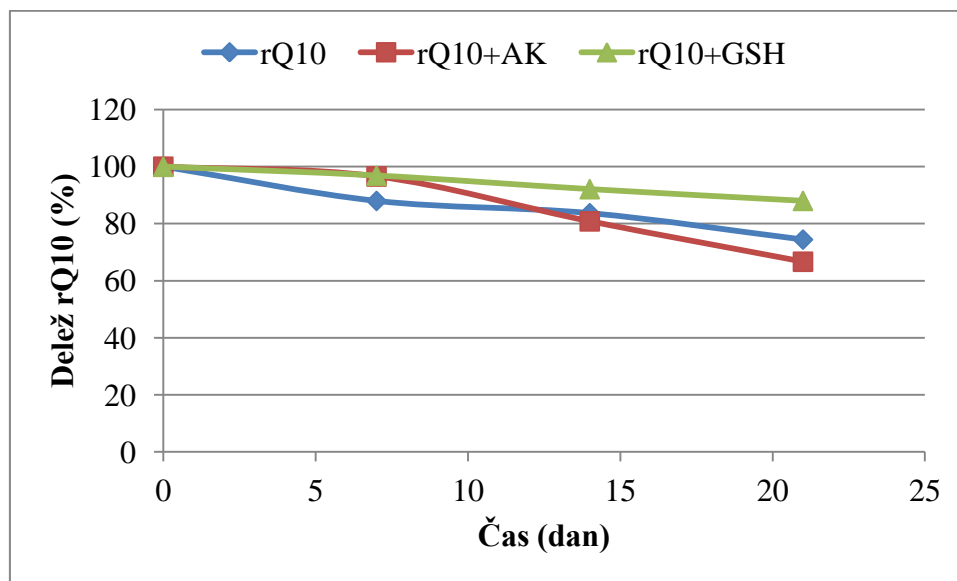
#### 4.5.2 Stabilnost reduciranega CoQ<sub>10</sub> v SLN

Osrednji namen diplomske naloge je bil preveriti stabilnost rQ<sub>10</sub> v disperziji SLN in dodatno povečati njegovo obstojnost z uporabo izbranih antioksidantov. Kot antioksidanta smo uporabili AK in GSH, ki sta se v predhodnih poskusih izkazala za najbolj primerna. Rezultati stabilnosti rQ<sub>10</sub> v SLN brez in z dodatkom antioksidantov pri shranjevanju na sobni temperaturi so prikazani na Sliki 18. Vsebnost rQ<sub>10</sub> se je tudi v SLN pričakovano zmanjševala s časom. Kombinacija z GSH se je izkazala kot najbolj stabilna, saj je bilo po 21 dneh še vedno približno 90 % reducirane oblike CoQ<sub>10</sub>. Vsebnost rQ<sub>10</sub> v SLN z in brez dodatka AK pa se ni bistveno razlikovala. Takšen rezultat je verjetno posledica dejstva, da je AK že prisotna v rQ<sub>10</sub> (priprava rQ<sub>10</sub> poteka s pomočjo AK, postopek 3.2.2.2). AK je



najverjetneje že dovolj za stabilizacijo  $rQ_{10}$  in zato naknadni dodatek AK nima stabilizirajočega učinka.

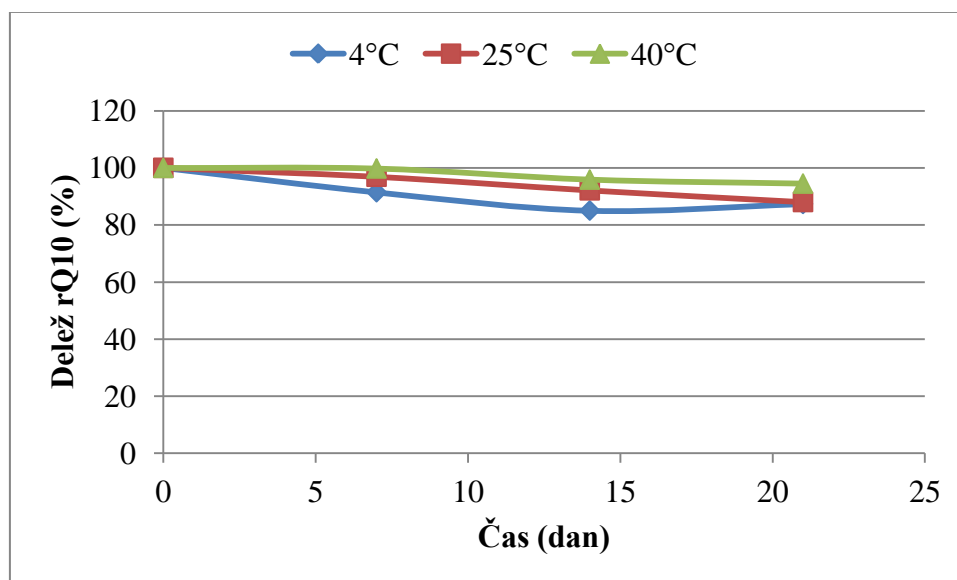
Dobljeni rezultati bistveno odstopajo od predhodne študije, kjer se je delež  $rQ_{10}$  v SLN po 7 dneh na sobni temperaturi zmanjšal na približno 10 % (26). V naši raziskavi je namreč pri enakih pogojih ostalo še vedno več kot 80 %  $rQ_{10}$ , pri vzorcu, ki je bil stabiliziran z GSH, pa celo 92 %.



Slika 18: Stabilnost reducirane oblike  $Q_{10}$  v disperziji SLN ob prisotnosti antioksidantov pri 25 °C.

SLN z vgrajenim  $rQ_{10}$  in dodanim GSH smo shranjevali tudi pri nižji (4 °C) in višji temperaturi (40 °C). Ne glede na temperaturo shranjevanja je bila obstojnost  $rQ_{10}$  znotraj časa študije nad 85 % (Slika 19), kar nakazuje na stabilen sistem. Ugotovili smo, da je  $rQ_{10}$  najbolj stabilen pri najvišji temperaturi, kar pa je v nasprotju s splošno prakso, saj reakcije nestabilnosti pogosteje potekajo pri višjih temperaturah. Tudi v prejšnji diplomski nalogi (26) je bil  $rQ_{10}$  v SLN najmanj stabilen pri 40 °C (0 % po 7 dneh) in najbolj stabilen pri 4 °C (10 % po 21 dneh). Vendar smo mi za pripravo  $rQ_{10}$  in njegovo stabilizacijo uporabili drug reducent kot predhodniki. Iz naših rezultatov stabilnosti  $rQ_{10}$  v raztopinah je razvidno, da gre v primeru, ko uporabimo višjo koncentracijo AK, za drugačno obnašanje –  $rQ_{10}$  je bolj stabilen pri višji temperaturi (Slika 12). Najverjetnejši razlog za ta fenomen je, da se pri višji temperaturi oks $Q_{10}$  lažje pretvarja v  $rQ_{10}$  in je posledično ravnotežje

pomaknjeno v smer  $rQ_{10}$ . To smo že predhodno dokazali pri pripravi  $rQ_{10}$  (Preglednica X). Prav tako smo pri proučevanju stabilnosti  $rQ_{10}$  ob dodatku GSH opazili, da delež  $rQ_{10}$  po določenem času pade in nato spet naraste (Slika 17), kar je skladno z rezultati stabilnosti v disperziji, saj se v zadnji časovni točki vsebnost  $rQ_{10}$  ne zmanjša bistveno oz. celo naraste pri 4 °C (Slika 19).



Slika 19: Stabilnost reducirane oblike  $Q_{10}$  v disperziji SLN ob prisotnosti GSH pri različnih temperaturah.

Na podlagi naše študije in primerjave s študijo iz prejšnjih let lahko zaključimo, da smo uspeli uspešno stabilizirati reducirano obliko  $Q_{10}$  v disperziji SLN s primernim postopkom izdelave reducirane oblike  $Q_{10}$  in z dodatno uporabo izbranega antioksidanta v disperziji SLN.

## 5. ZAKLJUČEK

V začetku eksperimentalnega dela smo prilagodili predhodno razvito analizno metodo za sočasno vrednotenje reducirane in oksidirane oblike CoQ<sub>10</sub>. S spremembo kromatografskih pogojev smo dobili simetrične kromatografske vrhove, hkrati pa se je občutno skrajšal tudi čas analize. rQ<sub>10</sub> je tekom priprave vzorcev za analizo s HPLC dlje časa izpostavljen visoki temperaturi. Ugotovili smo, da povišana temperatura (85 °C) in čas izpostavitve tej temperaturi nimata vpliva na končni delež rQ<sub>10</sub> v vzorcu. Dokazali smo, da je naša metoda linearna, selektivna in ponovljiva ter primerna za vrednotenje obeh oblik CoQ<sub>10</sub> v raztopinah in tudi v SLN.

Med preučevanjem priprave rQ<sub>10</sub> smo ugotovili, da je za njegovo pretvorbo iz oksidirane oblike pomembno ustrezno masno razmerje med oksQ<sub>10</sub> in reducentom. Za uspešno pretvorbo je pomemben ustrezen medij in razmerje med koncentracijama oksQ<sub>10</sub> in reducentom, ki mora biti pomaknjeno v smer reducenta (masno razmerje 1:5). Z uporabo EtOH in AK kot reducenta smo uspeli popolnoma reducirati oksQ<sub>10</sub> že po enem dnevu pri povišani temperaturi (60 °C), medtem ko so v prejšnji diplomski nalogi za redukcijo oksQ<sub>10</sub> potrebovali 6 dni, pretvorba v rQ<sub>10</sub> pa ni bila 100%.

V nadaljevanju smo se osredotočili na stabilizacijo rQ<sub>10</sub> in v ta namen preučevali vpliv temperature, medija, koncentracije in dodatka antioksidantov. Ugotovili smo, da je pri različnih temperaturah višja koncentracija (1 mg/mL) bolj stabilna kot nižja koncentracija rQ<sub>10</sub> (0,1 mg/mL). rQ<sub>10</sub> v raztopini je bil bolj stabilen v etanolu in praviloma pri nižjih temperaturah. Pripravili smo tudi raztopine rQ<sub>10</sub> z antioksidanti in ugotovili, da GSH in AK najbolj stabilizirata rQ<sub>10</sub>.

Trdni lipidni nanodelci predstavljajo dostavni sistem predvsem za lipofilne sestavine, mednje spada tudi rQ<sub>10</sub>. Izdelali smo prazne SLN, SLN z oksQ<sub>10</sub>, SLN z rQ<sub>10</sub> in SLN z rQ<sub>10</sub> in antioksidanti. Preučevali smo njihove fizikalne lastnosti in prišli do ugotovitve, da z vgrajevanjem AK pride do povečanja velikosti delcev in njihove fizikalne nestabilnosti. Z modifikacijo postopka izdelave SLN (podaljšan čas soniciranja) smo uspeli zmanjšati delce, vendar so bili kljub temu fizikalno izredno nestabilni. V prihodnje bodo potrebne nadaljnje raziskave za fizikalno stabilizacijo tovrstnih nanodelcev.

Na podlagi rezultatov stabilnosti rQ<sub>10</sub> smo v SLN z rQ<sub>10</sub> dodatno vgradili AK in GSH. Kombinacija z GSH se je izkazala za najbolj stabilno, saj je bilo po 21 dneh še vedno 90 % reducirane oblike CoQ<sub>10</sub>. AK smo uporabili že za redukcijo oksQ<sub>10</sub> in z njeno dodatno vgradnjo v SLN nismo uspeli povečati same stabilnosti rQ<sub>10</sub>. Nanodelce z GSH smo shranjevali pri 4 °C, 25 °C in 40 °C. Za najbolj stabilno se je izkazalo shranjevanje pri najvišji temperaturi, saj sama redukcija pri visoki temperaturi poteka hitreje in s tem je tudi sistem bolj stabiliziran, kar je specifično pri CoQ<sub>10</sub>. Na podlagi celotne raziskave lahko zaključimo, da smo z optimalno pripravo rQ<sub>10</sub> in uporabo ustreznih antioksidantov uspešno stabilizirali reducirano obliko CoQ<sub>10</sub> tudi po vgradnji v disperzijo SLN.

## 6. LITERATURA

1. Watson R. R, Zibadi S: Bioactive dietary factors and plants extracts in dermatology. Humana press, 2013.
2. Prošek M, Šmidovnik A, Jazbec P: Vloga CoQ<sub>10</sub> pri pretvorbi energije in obrambi organizma. Proteus 2008;71/2: 150–157.
3. [www.q10facts.com/a-brief-history-of-coenzyme-q10-2/](http://www.q10facts.com/a-brief-history-of-coenzyme-q10-2/). Dostop: julij 2016
4. Žmitek J, Žmitek K: CoQ<sub>10</sub> kot prehransko dopolnilo in zdravilo. Farmacevtski vestnik 2009; 60: 150–157.
5. Borekova M, Hojerova J, Koprda V, Bauerova K: Nourishing and health benefits of coenzyme Q<sub>10</sub> – a review. Czech Journal of Food Sciences 2008; 26: 229–241.
6. Rus P, Rus R: Koencim Q<sub>10</sub>. Zdravniški vestnik 2008; 47: 89–98.
7. <http://www.lifeextension.com/magazine/2008/2/Alleviating-Congestive-Heart-Failure-With-Coenzyme-Q10/Page-01>. Dostop: avgust 2016
8. Risk profile Coenzyme Q<sub>10</sub> and Idebenone, 15. 1. 2013.
9. [www.consumerlab.com/answers/Does+taking+natural+versus+synthetic+CoQ10+make+a+difference%3F+How+do+you+know+which+product+is+natural+or+synthetic%3F/natural\\_vs\\_synthetic\\_CoQ10/](http://www.consumerlab.com/answers/Does+taking+natural+versus+synthetic+CoQ10+make+a+difference%3F+How+do+you+know+which+product+is+natural+or+synthetic%3F/natural_vs_synthetic_CoQ10/). Dostop: junij 2016
10. [www.q10qh.com/ubiquinone-or-ubiquinol-does-it-really-matter](http://www.q10qh.com/ubiquinone-or-ubiquinol-does-it-really-matter). Dostop: junij 2016
11. Boyer R: Temelji biokemije. Študentska založba. Ljubljana, 2008.
12. Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja – radikali in druge reaktivne snovi v telesu. Slovensko farmacevtsko društvo 2015.
13. [www.tga.gov.au/sites/default/files/cm-cg-ubiquinol-10.pdf](http://www.tga.gov.au/sites/default/files/cm-cg-ubiquinol-10.pdf). Dostop: junij 2016
14. Milivojević Fir M, Milivojević L, Prošek M, Šmidovnik A: Property studies of coenzyme Q<sub>10</sub> – cyclodextrins complexes. Acta Chimica Slovenica 2009; 56: 885–891.
15. [lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/coenzyme-Q10](http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/coenzyme-Q10). Dostop: junij 2016
16. Vinson J, Anamandla S: Comparative topical absorption and antioxidant effectiveness of two forms of coenzyme Q<sub>10</sub> after a single dose and after long-term supplementation in the skin of young and middle-aged subjects. IFSCC Magazine 2005; 8: 1–6.
17. Hoppe U, Bergemann J, Diembeck W, Ennen J, Gohla S, Harris I, Jacob J, Kielholz J, Mei W, Pollet D, Schachtschabel D, Sauermann G, Schreiner V, Stäb F,

- Steckel F: Coenzyme Q<sub>10</sub>, a cutaneous antioxidant and energizer. *BioFactors* 1999; 9: 371–378.
18. Puizina Ivić N: Skin aging. *Acta dermatoven APA* 2008; 17: 47–54.
  19. Farge M. A, Miller K. W, Elsner P, Maibach H. I: Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *International journal of cosmetics science* 2008; 30: 87–95.
  20. Osredkar J: Oksidativni stres. *Zdravniški vestnik* 2012; 81: 393–406.
  21. Kagan E. V, Quinn J. P: Coenzyme Q: Molecular mechanisms in health and disease. CRC Press, 2001.
  22. Frei B, Kim C. M, Ames N. B: Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1990; 87: 4879–4883.
  23. Yadav N, Khatak S, Vir Singh Sara U: Solid lipid nanoparticles – a review. *International Journal of Applied Pharmaceutics* 2013; 5: 8–18.
  24. Larson E, Ognowski J: Solid Lipid Nanoparticles – characteristics, application and obtaining. *CHEMIK* 2011; 65: 960–967.
  25. Müller R. H, Mäder K, Gohla S: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2000; 50: 161–177.
  26. Brezovar L: Izdelava in stabilnost trdnih lipidnih nanodelcev s koencimom Q<sub>10</sub>. (Diplomska naloga, FFA 2014).
  27. Reza Mozafari M: Nanocarrier technologies: Frontiers of nanotherapy. Springer 2006: 56–65
  28. Lopez Garcia R, Ganem Rondero A: Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): Occlusive effect and penetration enhancement ability. *Journal of cosmetics, dermatological sciences and applications* 2015; 5: 62–72.
  29. Üner M: Preparation, characterization and physico-chemical properties of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Their benefits as colloidal drug carrier systems. *Pharmazie* 2006; 61: 375–38.
  30. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1). November 2005.

31. Hafner Š: Vgrajevanje koencima Q<sub>10</sub> v lipidne nanodelce in razvoj metode za njegovo določanje v formulaciji (Diplomska naloga, FFA 2014).