

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA STEINER

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA STEINER

MAGISTRSKA NALOGA

**VREDNOTENJE VSEBNOSTI IN STABILNOSTI KOENCIMA Q10 V
ZDRAVILIH IN PREHRANSKIH DOPOLNILIH Z METODAMI TEKOČINSKE
KROMATOGRAFIJE VISOKE LOČLJIVOSTI**

**EVALUATION OF THE CONTENT AND STABILITY OF COENZYME Q10 IN
MEDICINES AND NUTRITION SUPPLEMENTS BY HIGH PERFORMANCE
LIQUID CHROMATOGRAPHY METHODS**

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2018

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

Zahvala

Najlepše se zahvaljujem svojemu mentorju, izr. prof. dr. Robertu Roškarju, mag. farm, za predanost, nasvete, strokovno pomoč ter prijetno vzdušje pri praktičnem delu in pisanju magistrske naloge. Hvala tudi ostalim sodelavcem Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko za pomoč pri delu v laboratoriju.

Iskreno se zahvaljujem moji družini, ki me je ves čas študija podpirala, spodbujala in verjela vame.

Izjava

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

Tjaša Steiner

Komisija za zagovor:

Predsednik komisije: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

Mentor: izr. prof. dr. Robert Roškar, mag. farm.

Članica komisije: asist. dr. Alenka Šmid, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA	I
POVZETEK.....	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 BIOSINTEZA IN RAZPOREDITEV Q10 V TELESU	1
1.2 FARMAKOKINETIKA Q10.....	2
1.3 VLOGA Q10 V TELESU	4
1.3.1 Pomanjkanje Q10.....	5
1.3.2 Vnos in uporaba Q10	6
1.4 STABILNOST Q10	11
1.5 KAKOVOST IZDELKOV S Q10 ZA PERORALNO UPORABO	12
1.6 METODE ZA MERJENJE VSEBNOSTI Q10	14
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	17
3.1.1 Reagenti, topila in standard	17
3.1.2 Izdelki s Q10	17
3.1.3 Naprave in pribor	20
3.2 METODE.....	21
3.2.1 Priprava mobilne faze, standarda in drugih raztopin	21
3.2.2 Optimizacija analiznih metod	22
3.2.3 Vrednotenje instrumentalne HPLC metode.....	25
3.3 VREDNOTENJE VSEBNOSTI IN STABILNOSTI Q10 V IZDELKIH	28
3.3.1 Vsebnost Q10 v izdelkih.....	28
3.3.2 Primerjava analiznih metod	29
3.3.3 Stabilnost Q10 v izdelkih	30
3.4 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	31
3.4.1 Vrednotenje instrumentalne HPLC metode.....	31
3.4.2 Vsebnost Q10 v izdelkih in preverjanje analiznih metod.....	32
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	34
4.1 OPTIMIZACIJA ANALIZNIH METOD	35
4.2 VREDNOTENJE INSTRUMENTALNE HPLC METODE	36
4.3 VSEBNOST Q10 V IZDELKIH	38
4.3.1 Izdelka z navedenim rQ10.....	40
4.3.2 Izdelki z navedenim oQ10	40
4.3.3 Vsebnost skupnega Q10.....	42
4.4 PRIMERJAVA ANALIZNIH METOD	44
4.5 STABILNOST Q10 V IZDELKIH	48
4.5.1 Izdelka z navedeno rQ10.....	49
4.5.2 Izdelki z navedeno oQ10 brez AK	50
4.5.3 Izdelki z navedeno oQ10 in AK	52
4.5.4 Vsebnost skupnega Q10.....	55

5 SKLEP	58
6 LITERATURA	60
7 PRILOGE	65

POVZETEK

Eksogeni vnos koencima Q10 (Q10), ki je nujen za delovanje celic in je edini endogeni lipofilni antioksidant, je pomemben zaradi zmanjševanja hitrosti njegove biosinteze s starostjo. Rezultati novjših študij kažejo, da je zaradi večje absorpcije boljše izbira reducirana oblika (rQ10), ki sicer velja za manj stabilno obliko Q10. Čeprav si obliki nista enakovredni, v trenutnih predpisih preverjanja kakovosti najdemo samo kriterije o vsebnosti skupnega Q10 v izdelkih.

Preskusili smo 3 že razvite metode za merjenje vsebnosti Q10: metodo za sočasno merjenje vsebnosti rQ10 in oksidirane oblike Q10 (oQ10) ter metodi za merjenje skupnega Q10, ki vključujeta oksidacijo oz. redukcijo Q10 v vzorcu. Izbrali smo 10 izdelkov v obliki mehkih in trdih kapsul (zdravilo in prehranska dopolnila) z navedeno oQ10 oz. rQ10. Nekateri so vsebovali tudi askorbinsko kislino (AK). Metodi priprave vzorcev z oksidacijo oz. redukcijo vzorca smo dodatno optimizirali. Vpeljane spremembe niso vplivale na ustreznost kromatografske analizne metode, saj smo dokazali ustrezno selektivnost, linearnost, točnost in natančnost pri merjenju vsebnosti Q10. S tremi uporabljenimi metodami smo dobili primerljive rezultate vsebnosti skupnega Q10, kar smo tudi potrdili s statističnim testom.

Kvantitativno smo vrednotili vsebnost in stabilnost posameznih oblik in skupnega Q10 v izdelkih. Ugotovitve smo dodatno preverili z izvedbo pospešene stabilnostne študije pri temperaturi 40 °C in relativni vlažnosti 75 %, ki je trajala 3 mesece. Izdelka z navedeno rQ10 sta ustrezala zahtevam Ameriške farmakopeje (90,0 – 115,0 % navedene vsebnosti) v vsebnosti navedene oblike in skupnega Q10 tudi po koncu pospešene stabilnostne študije. Pri izdelkih z navedeno oQ10 je bila vsebnost oQ10 pred izvedbo študije znotraj mej pri 2 izdelkih od 8, če smo upoštevali skupni Q10 pa pri 4 izdelkih. V večini izdelkov v obliki mehkih kapsul je bilo neskladje vsebnosti oQ10 večje pri izdelkih z AK, kar so potrdili tudi rezultati merjenja vsebnosti Q10 v različnih serijah zdravila z različno dolгим časom od izdelave, ki so bili shranjeni pri sobnih pogojih. V izdelkih v obliki trdih kapsul AK ni vplivala na pretvorbo oQ10. Vsebnost skupnega Q10 ni bila ustrezna pri 4 izdelkih od 10, od tega je en izdelek imel vsebnost preseženo, pri treh pa je bila nižja od 90 %. Ker se je vsebnost skupnega Q10 izrazito manj znižala kot razmerje med posameznima oblikama Q10, sklepamo, da se obliki med shranjevanjem pretvarjata ena v drugo. S stališča kakovosti je prisotnost obeh oblik Q10 neprimerna, če to ni navedeno, vendar so takšni izdelki zaradi večje biološke uporabnosti rQ10 boljši, kot če bi vsebovali samo oQ10.

Ključne besede: koencim Q10, HPLC, vsebnost, stabilnost, askorbinska kislina

ABSTRACT

Coenzyme Q10 (Q10) as the only endogenous lipophilic antioxidant is essential for proper cell functions in our body. Q10 supplementation is important because the rate of its biosynthesis decreases with age. New studies have shown that the reduced Q10 (rQ10) is preferred due to its higher bioavailability, but is also the less stable form of Q10. In the current quality control regulations there are only criteria for content determination of the total Q10 in final products, even though both forms of Q10 are not equivalent.

Three previously developed methods for Q10 determination in products were tested: a method for simultaneous determination of rQ10 and oxidised Q10 (oQ10), and two methods including either complete oxidation or reduction of the Q10 in the sample for determination of the total Q10. Ten products in form of soft or hard capsules were tested (medicine and dietary supplements) with labelled oQ10 or rQ10. Ascorbic acid (AA) was also present in some products. Both methods with Q10 conversions were additionally optimised and the adequacy of the instrumental method was proved in terms of selectivity, linearity, accuracy, and precision. All three used methods provided comparable results of the total Q10 content in the tested products, which was also confirmed by a statistical test.

The main objective of our thesis was to evaluate the content and stability of both Q10 forms and the total Q10 in selected products. The findings were supported by a 3-month accelerated stability study (40 °C and 75 % relative humidity). Both products with labelled rQ10 met the United States Pharmacopoeia acceptance criteria (90.0 – 115.0 % labelled amount of Q10 content) for the rQ10 and the total Q10 content even until the end of the stability study. In the oQ10 labelled group 2 out of 8 products met requirements for the oQ10 and 4 products for the total Q10 content at the beginning of the study. Deviations from the labelled oQ10 content were greater in soft capsules with AA. The same was also proved for the medicine stored at room temperature by comparison the Q10 content of batches with various shelf lives. In hard capsules the conversion of oQ10 was not affected by AA. In 6 out of 10 products the total Q10 content met the specification limit; one product substantially exceeded and three products were slightly under 90 %. Stability study showed that the total Q10 is considerable more stable than both Q10 forms, which leads to a conclusion that the main instability is the conversion between both forms. A product is not suitable in terms of its quality if a Q10 form is present but not labelled. This especially counts for the rQ10 which is the preferred form of Q10 due to its higher bioavailability.

Keywords: coenzyme Q10, HPLC, content, stability, ascorbic acid

SEZNAM OKRAJŠAV

ACN = acetonitril

AK = askorbinska kislina (vitamin C)

AUC = površina pod krivuljo (ang. Area Under Curve)

AVE = povprečje (ang. average)

EtOH = etanol

HPLC = tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Performance Liquid Chromatography)

MeOH = metanol

MM = molekulska masa

MQ = ultra čista voda (voda, pridobljena s sistemom Milli-Q®)

oQ10 = oksidirana oblika koencima Q10 = ubikinon

QC = kontrolni vzorec (ang. Quality Control)

Q10 = koencim Q10

rQ10 = reducirana oblika koencima Q10 = ubikinol

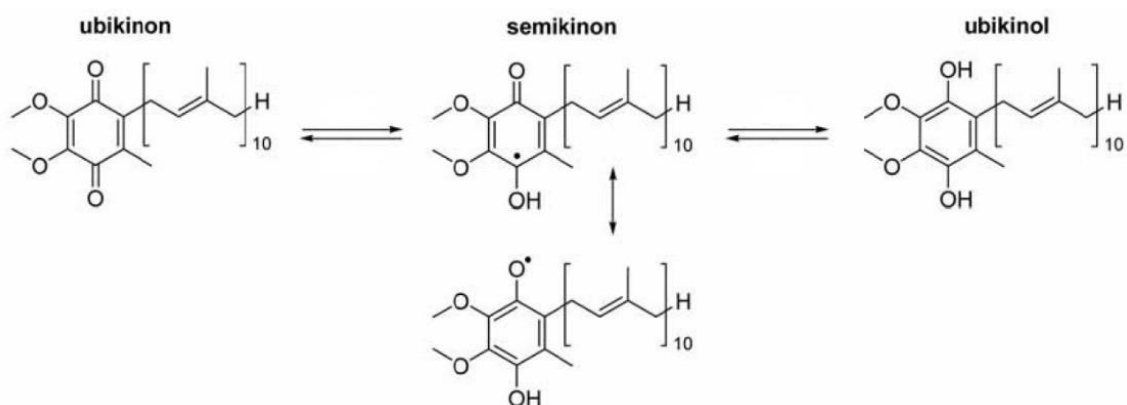
RSD = relativni standardni odklon (ang. Relative Standard Deviation)

SE = standardna napaka (ang. Standard Error)

USP = Ameriška farmakopeja (ang. United States Pharmacopeia)

1 UVOD

Ubikinon je dobil svoje ime zaradi prisotnosti v številnih organizmih (lat. ubiquitous pomeni povsod prisoten) in svoje strukture. Imenujemo ga tudi koencim Q, saj ima v telesu vlogo koencima. Molekula je sestavljena iz benzokinonskega obroča, ki ji omogoča oksidacijo in redukcijo, in lipofilnega dela, ki je zgrajen iz več izoprenoidnih enot (1, 2). Njihovo število je odvisno od vrste organizma, ki sintetizira koencim Q, in je lahko od 6 do 10 (3). Pri ljudeh je ta del molekule sestavljen iz 10 enot, zato ga imenujemo koencim Q10 oz. ubidekarenon (1). Zaradi dolgega nepolarne repa ima koencim Q10 (v nadaljevanju Q10) lipofilne lastnosti. Q10 lahko obstaja v popolnoma oksidirani (v nadaljevanju ubikinon, oQ10), delno oksidirani (semikinon) ali popolnoma reducirani obliki (v nadaljevanju ubikinol, rQ10) (4). Pretvarjanje med različnimi oblikami Q10 je predstavljeno na Sliki 1. Že hitro po njegovem odkritju so ugotovili, da ima pomembno vlogo pri delovanju organizma, zato so mu rekli tudi vitamin Q (5). Vendar Q10 ne spada med vitamine, saj ga telo proizvaja samo (6). Takšno poimenovanje bi bilo smiselno le pri starejših ljudeh, saj se z leti njegova biosinteza upočasni (7).



Slika 1: Pretvarjanje Q10 med različnimi redoks oblikami (Prirejeno po viru 4)

1.1 Biosinteza in razporeditev Q10 v telesu

Kaskado reakcij biosinteze Q10 lahko razdelimo na 3 stopnje (1). Sinteza benzokinonskega obroča iz tirozina ali fenilalanina in sinteza stranske verige iz acetil-koencima A potekata ločeno v citosolu. Nato v zadnji stopnji pride do združenja v Q10 v mitohondriju (3, 8). Sinteza stranske verige poteka po mevalonatni poti, ki je del sinteze številnih drugih lipidov v telesu. Pomemben del te poti je encim hidroksimetilglutaril-koencim A reduktaza (HMG-CoA reduktaza), ki je glaven encim v regulaciji biosinteze holesterola (9). Danes za zdravljenje hiperholesterolemije pogosto uporabljamo statine (zdravilne učinkovine, ki so

zaviralci HMG-CoA reduktaze). Dolgoročno jemanje zaviralcev mevalonatne poti lahko zmanjša endogeno sintezo Q10 (1). Tudi nekatere druge zdravilne učinkovine iz skupin tricikličnih antidepresivov, antipsihotikov, peroralnih antidiabetikov in antagonistov β adrenergičnih receptorjev zavirajo encime biosinteze Q10 (8). Regulatornih mehanizmov biosinteze Q10 še ne poznamo v celoti (9). Eksogeni vnos Q10 ne zmanjša biosinteze Q10, saj naj bi bila ta odvisna predvsem od potreb celic oz. tkiva po energiji in od produktov, nastalih zaradi oksidativnega stresa (5, 10).

V telesu odraslega človeka je približno 2 g Q10, ki se nahaja vezan na lipidni dvosloj membran (večina ga je na notranji mitohondrijski membrani), vezan na proteine ali v obliki micelarnih agregatov (4). Njegova vsebnost v telesu se povečuje do 20. leta starosti, nato začne padati. Največji upad je med 25. in 40. letom starosti. Po 80. letu lahko pade pod nivo, ki smo ga imeli ob rojstvu (9, 11). Koncentracija Q10 v tkivih ob normalni prehrani (brez dodatnega vnosa Q10) ni odvisna od njegovega vnosa s hrano, ampak od aktivnosti biosinteze Q10 oz. števila mitohondrijev (9). Najvišje koncentracije Q10 so izmerili v organih, ki so najbolj aktivni (srce, jetra, ledvice in trebušna slinavka) (8). Koncentracija Q10 v mitohondrijih se z leti zmanjšuje zaradi upočasnjene biosinteze. Zelo veliko zmanjšanje koncentracije Q10 pri starostnikih so opazili v srcu, trebušni slinavki in možganih (12).

Serumska koncentracija Q10 pri zdravih odraslih ljudeh je med 0,35 in 1,47 mg/l (13, 14). Odvisna je od eksogenega vnosa Q10 in povezana s koncentracijo lipoproteinov, kar je smiselno upoštevati pri vrednotenju izmerjenih koncentracij Q10. Če serumsko koncentracijo Q10 uravnamo na serumsko koncentracijo holesterola, dobimo statistično značilne razlike med spoloma. Serumske koncentracije Q10 so pri moških višje v vseh starostnih skupinah, kar kaže na večjo potrebo po Q10 pri moških ali na večjo dovzetnost za oksidativni stres pri ženskah (3, 12).

Tkiva oz. organi se razlikujejo tudi v deležu oQ10. Ubikinon prevladuje v možganih in pljučih, v ostalih organih je večji delež ubikinola. Delež rQ10 je večji od 75 % v plazmi, trebušni slinavki, jetrih, črevesju, ledvicah in testisih (5). Delež oQ10 je večji pri najstarejši starostni skupini (starejši od 61 let) (12). Mehanizma regeneracije ubikinola še ne poznamo v celoti. Vemo le, da so za redukcijo Q10 potrebni encimi (reduktaze) (9).

1.2 Farmakokinetika Q10

Absorpcija Q10 temelji na emulzifikaciji in tvorbi micelov z izločki trebušne slinavke in

žolčnika v tankem črevesju (15). Predvidevajo, da gre pri njegovi absorpciji za kombinacijo pasivnih in aktivnih mehanizmov (16). Absorpcija je boljša, če ga zaužijemo skupaj s hrano in v manjših odmerkih (4, 16). Delež absorbiranega Q10 je manjši, če ga zaužijemo skupaj z večjo količino vitamina E, ki sta v izdelkih pogosto skupaj, ker naj bi prišlo do njunega tekmovanja med absorpcijo (10).

V enterocitih potече redukcija Q10, zato je večina absorbiranega Q10 (95 %) v reducirani obliki še pred vstopom v limfni obtok (15). Tako se zdi, da redoks oblika Q10 v izdelku nima vpliva na absorpcijo Q10 (4). Vendar je biološka uporabnost ubikinola večja od biološke uporabnosti ubikinona tako pri nesolubiliziranih kot solubiliziranih oblikah (10, 17). Večjo biološko uporabnost rQ10 so potrdili tudi pri dnevnem odmerku 300 mg, kjer je ubikinol dosegel 3-krat večje plazemske koncentracije kot oQ10 v farmacevtskih oblikah iste vrste (16). Učinkovitost absorpcije ubikinona se z večanjem enkratnega odmerka manjša, pri rQ10 pa je učinkovitost absorpcije do 300 mg enkratnega odmerka neodvisna od zaužite količine rQ10 (10). Novejše raziskave kažejo, da bi lahko bila redukcija v ubikinol omejujoč dejavnik hitrosti absorpcije Q10, če je koncentracija Q10 v micelih velika (15).

Q10 se veže na hilomikrone in gre v kri preko limfe (15). Biološka uporabnost Q10 je majhna (4). V krvni obtok ga pride 2 - 4 %, po nekaterih podatkih do 10 % (9, 18). V jetrih se veže na lipoproteine. Največjo afiniteto ima do VLDL (lipoprotein zelo nizke gostote) in LDL (lipoprotein nizke gostote) (9, 16). V normalnih razmerah ne vstopa v tkiva, saj ga celice same sintetizirajo v zadostni količini (9). Celice začnejo privzemati Q10 iz krvi oz. celične membrane, ko v njih pride do pomanjkanja Q10. Privzem je večji pri hujših oblikah pomanjkanja. Rezultati raziskav kažejo, da ima vneseni Q10 tudi posredni vpliv na povečanje svoje koncentracije v tkivih preko različnih poti signaliziranja (redoks signaliziranje, kot primarni in sekundarni prenašalec) (9).

Večina absorbiranega Q10 se shrani v lizosomih ali metabolizira in izloči preko ledvic z urinom ali preko jeter in žolča z blatom (9). Farmakokinetične raziskave so pokazale enterohepatično kroženje, saj ima krivulja plazemskih koncentracij Q10 po zaužitju izdelkov s Q10 dva vrha (19). Njegov razpolovni čas je v povprečju 4 dni. Pri zdravih ljudeh telo obnavlja Q10 predvsem z endogeno sintezo (4, 9). Plazemske koncentracije Q10 se ustalijo po 3 - 4 tedenskem rednem jemanju Q10 in se vrnejo na začetno stanje čez vsaj 2 tedna po prenehanju jemanja Q10 (16).

1.3 Vloga Q10 v telesu

Vloga Q10 temelji na sodelovanju v redoks reakcijah, kar mu omogoča kinonska struktura. Z oddajanjem in sprejemanjem elektronov prehaja med oQ10 in rQ10 (4). Delovanje Q10 lahko razdelimo na 2 skupini: prenos elektronov in antioksidativno delovanje. Pri prenosu elektronov se mora Q10 nahajati v oksidirani obliki, da lahko sprejme elektrone. Pri tem se reducira in se z oddajo elektronov ponovno vrne v oksidirano obliko. To nalogo, ki je nujna za normalno delovanje celice, opravlja predvsem v mitohondrijih. Najprej so dokazali vlogo Q10 pri nastanku molekule ATP (adenozin trifosfata). Q10 je eden izmed elektronskih prenašalcev v dihalni verigi. Naenkrat sprejme po 2 elektrona iz kompleksa I (NADH:ubikinon oksidoreduktaza) ali kompleksa II (sukcinat:ubikinon oksidoreduktaza) in se pri tem popolnoma reducira. Kompleksu III (ubikinol:(feri)citokrom c oksidoreduktaza) lahko naenkrat odda le 1 elektron, zato se pri tem delno oksidira do semikinonske oblike, ki se z oddajanjem drugega elektrona oksidira nazaj do ubikinona (4, 5, 20). Q10 je nujen tudi za sintezo pirimidinov (sinteza DNA (deoksiribonukleinska kislina)). Sodeluje pri prenosu elektronov skozi membrano lizosomov in s tem vzdržuje ustrezen pH celice ter vpliva na stabilnost in prepustnost celičnih membran (1, 8, 9).

Kot antioksidant deluje le rQ10 (9). Ubikinol je edini endogeni antioksidant, ki je topen v lipidih. Pred radikali ščiti različne celične strukture: lipide, proteine in DNA. Veliko reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) nastane v celicah že pri njihovem normalnem delovanju, predvsem v mitohondrijih (4, 8). Ubikinol deluje tako, da preprečuje in ustavlja lipidno peroksidacijo. Ker je vezan na celične membrane, se nahaja blizu nastanka lipidnih radikalov. Tako lahko z njimi reagira že v začetnih stopnjah in jih pretvori v manj reaktivne radikale. Širjenje lipidne peroksidacije zavira tudi posredno z regeneracijo vitaminov E in C v lipoproteinih in membranah. S tem poveča antioksidativno delovanje vitamina E, saj je njegova regeneracija drugače odvisna predvsem od askorbinske kisline (AK), ki pa je vodotopen vitamin (3, 5, 7). Pomembno vlogo ima tudi v drugih delih celice in v krvi. Izmed teh je najpomembnejša naloga varovanje LDL pred oksidacijo. Pri ljudeh, ki so uživali prehranska dopolnila s Q10, je bila odpornost LDL na oksidacijo povečana (5, 9). Q10 reagira tudi z radikali, ki nastanejo pri vnetnih procesih zaradi delovanja nevtrofilcev. Vpliva na sintezo oz. delovanje vnetnih dejavnikov (citokinov, interlevkinov in prostaglandinov), ščiti endotelijske celice pred oksidativnimi poškodbami v primeru ishemije in izboljša endotelijsko disfunkcijo. Vpliva tudi na rast celice in zavira njeno apoptozo (3, 5, 9).

1.3.1 Pomanjkanje Q10

Vzroki za zmanjšanje količine Q10 v telesu so lahko na ravni nastanka oz. pridobivanja Q10 (pri starostnikih in določenih obolenjih, nizek vnos s hrano) ali na ravni povečane porabe (povečan aerobni metabolizem, stanja, ki jih spremlja oksidativni stres) (4, 8, 18). Pomanjkanje Q10 je definirano kot zmanjšana raven Q10 v tkivih oz. celicah (1). Ker je krvna koncentracija odvisna od eksogenega vnosa Q10, je za diagnostiko pomanjkanja Q10 primerna analiza tkiva in ne krvne koncentracije (1, 7, 12). Za diagnosticiranje pomanjkanja Q10 uporabljamo vzorec skeletne mišice ali kožnih fibroblastov (1). Za vzorce skeletnih mišic so referenčne vrednosti za Q10 med 20 in 34 $\mu\text{g/g}$ tkiva. V literaturi lahko najdemo še drugačne referenčne vrednosti za Q10 v bioloških vzorcih, saj ni enotno sprejetega referenčnega območja. Prav tako še ni enotno sprejete enote, v kateri bi bilo najbolje podajati koncentracijo Q10 v bioloških vzorcih. (14).

Do primarnega pomanjkanja Q10 pride zaradi mutacije v genih z zapisi za proteine, ki sodelujejo v biosintezi Q10. Sekundarno pomanjkanje Q10 je posledica okvar v delovanju mitohondrijev, ki posredno vplivajo na biosintezo Q10 (3). Motnje zaradi primarnega pomanjkanja Q10 se lahko pojavijo v vseh starostnih obdobjih. Simptomi in znaki so zelo različni. Prizadenejo različne organe, najpogosteje ledvice, živčni sistem, mišice, srce in jetra. Okvare nastanejo zaradi motenj v delovanju celic, saj pride do pomanjkanja ATP, povečanega nastanka ROS, apoptoze in motenj v metabolizmu nukleinskih kislin (1). Znižane koncentracije ubikinona v obolelih tkivih so izmerili tudi pri kardiomiopatijah, degenerativnih mišičnih boleznih in jetrnem celičnem karcinomu. Razmerje med LDL in ubikinonom je večje pri ljudeh z ishemično boleznijo srca in družinsko hiperholesterolemijo (5, 9).

Plazemska koncentracija Q10 je uporabna za oceno t.i. funkcionalnega statusa Q10, ki opisuje njegovo antioksidativno delovanje. Povečanje deleža oQ10 kaže na povečan oksidativni stres v organizmu (7, 12). Večji delež ubikinona so izmerili pri ljudeh z večjim indeksom telesne mase. Z nižanjem koncentracije skupnega Q10 s starostjo se viša delež oQ10, kar še bolj zmanjša antioksidativno zaščito (12). Povečana fizična aktivnost pri starejših ljudeh pozitivno vpliva na koncentracijo skupnega Q10, premakne ravnotežje v smeri rQ10 in zmanjša lipidno peroksidacijo (3, 12). Znižana koncentracija Q10 v organizmu zmanjša zaščito pred oksidativnim stresom, kar vodi v večji obseg poškodb proteinov, lipidov in DNA. Razvoj bolezni oz. stanj, povezanih s starostjo, kot so različne degenerativne bolezni, je torej lahko odvisen tudi od manjše zmožnosti organizma, da

proizvede dovolj ubikinola za svoje potrebe. Če so produkti oksidativnega stresa v telesu prisotni dalj časa, se biosinteza Q10 poveča kot obrambni mehanizem telesa. To kažejo tudi primerjave plazemskih koncentracij Q10 med kadilci in nekadilci. Krvna koncentracija skupnega Q10 se veča z daljšim časom trajanja kajenja (5, 21).

1.3.2 Vnos in uporaba Q10

Hrana vsebuje relativno malo Q10. Največ ga vsebuje meso (govedina, svinjina, perutnina; do 40 mg/kg), ribe (do 67 mg/kg) in rastlinska olja (predvsem olivno; do 160 mg/kg). Manj ga najdemo v sadju in zelenjavi (oreški, avokado, peteršilj; do 27 mg/kg), jajcih (do 1,5 mg/kg) in mlečnih izdelkih (do 0,4 mg/kg) (4, 11, 18). Nekatera hrana vsebuje tudi ubikinol, čeprav je manj stabilen. To so predvsem živila z veliko antioksidanti (22). Na vsebnost Q10 v hrani vpliva geografsko poreklo, vsebnost maščob (živila z večjo vsebnostjo maščob imajo večinoma večjo vsebnost Q10) in predelava hrane (Q10 se med nekaterimi tehnološkimi procesi uniči). Z raznovrstno prehrano naj bi bil njegov dnevni vnos 3 – 6 mg, kar je dovolj za zdravega človeka. V primeru zmanjšane biosinteze ali povečane potrebe po Q10 pa vnos s hrano ni zadosten. (4, 18). Za vstop v tkiva mora biti njegova serumska koncentracija vsaj 2 mg/l (oz. mora biti dnevni vnos vsaj 100 mg Q10), za vstop preko krvno-možganske pregrade so vrednosti še večje. Takšnih odmerkov samo s prehrano ne moremo doseči (10, 13, 18). Različne prehranjevalne navade pogosto ne omogočajo zadostnega vnosa potrebnih hranil ali drugih snovi. Zaradi fiziološkega zniževanja hitrosti biosinteze Q10 s starostjo in nizke vsebnosti v običajni prehrani je uporaba izdelkov s Q10 smiselna.

Iz obstoječih študij lahko sklepamo na varnost Q10 tudi pri relativno velikih odmerkih. Jemanje višjih odmerkov (300 mg dnevno) je varno glede kronične toksičnosti, saj ni kopičenja Q10 v tkivih (11). Najbolj zanesljiv podatek je iz dobro zastavljene študije, v kateri so uporabljali 1200 mg Q10 (3). Neželeni učinki niso resni (slabost, zgaga, razdražljiv želodec) in niso povezani z odmerkom. Lahko bi bili tudi posledica pomožnih snovi v izdelkih, kot so olja (11). Svetujejo, da ljudje, pri katerih se hitro razvijejo simptomi v prebavnem traktu, izdelke uživajo skupaj s hrano (17). Previdnost je potrebna pri tistih, ki hkrati jemljejo varfarin, saj lahko Q10 zmanjša njegovo učinkovitost (11).

Za večino indikacij še nimamo nedvoumnih dokazov o učinkovitosti zdravljenja s Q10 pri ljudeh, saj se rezultati študij razlikujejo ali niso dovolj zanesljivi zaradi zasnove študij (3, 8,

23). Enotno mnenje je, da je Q10 primeren kot podpora glavnemu zdravljenju predvsem pri starejših ljudeh, saj je pri njih biosinteza že fiziološko zmanjšana, in tistih s kroničnimi boleznimi. Tako preprečimo oz. zmanjšamo kronični oksidativni stres, ki vpliva na njihov razvoj (3, 11). Zaradi pozitivnih učinkov je smiselno dopolnjevanje prehrane s Q10 pri ljudeh s sladkorno boleznijo, nevrodegenerativnimi boleznimi, metaboličnem sindromu, boleznih ledvic in težavami s plodnostjo (3, 7).

Pri sindromu primarnega pomanjkanja Q10 je potrebno z zdravljenjem s Q10 začeti čim prej, ko poškodbe še niso ireverzibilne. Vnos Q10 uspešno ustavi razvoj encefalopatije in retinopatije (1). Leta 2016 je EMA (Evropska agencija za zdravila) uvrstila ubikinol med zdravila sirote za zdravljenje sindroma primarnega pomanjkanja Q10 (24). Učinkovitost terapije s Q10 so dokazali tudi pri naslednjih skupinah bolezni:

- srčno-žilne bolezni: povečan vnos Q10 zmanjša obseg ishemičnih poškodb tkiva pri infarktu, srčnem popuščanju in okvarah srčnih zaklopk (25). Preventivna uporaba Q10 pred operacijo srca zmanjša pojav aritmij (3).

- kronično vnetje (revmatoidni artritis, multipla skleroza, odpoved ledvic, maščobna jetrna bolezen): s povečanim vnosom Q10 zmanjšamo obseg poškodb, nastalih zaradi oksidativnega stresa, in znižamo koncentracijo vnetnih dejavnikov (3).

- Parkinsonova bolezen: terapija s Q10 je uspešna pri tistih, pri katerih na razvoj bolezni vpliva nenormalno delovanje mitohondrijev zaradi okvare v genih z zapisi za proteine dihalne verige (26). Upočasnimo funkcionalno poslabšanje bolezni (3).

- metabolični sindrom, sladkorna bolezen (lipidna peroksidacija): Q10 z varovanjem LDL pred oksidacijo upočasnjuje proces ateroskleroze (9). Učinkovit je pri znižanju serumske koncentracije trigliceridov in plazemske koncentracije lipoproteina(a) (3).

Na voljo imamo veliko izdelkov s Q10, ki pa si niso enakovredni (4, 25, 27). Razdelimo jih lahko na 3 skupine: zdravila, prehranska dopolnila in funkcionalna živila. (4, 18).

Zdravila

V Zakonu o zdravilih je zdravilo definirano kot "vsaka snov ali kombinacija snovi, ki so predstavljene z lastnostmi za zdravljenje ali preprečevanje bolezni pri ljudeh ali živalih", ali "ki se lahko uporabljajo oz. dajejo ljudem ali živalim z namenom, da bi se ponovno vzpostavile, izboljšale ali spremenile fiziološke funkcije prek farmakološkega, imunološkega ali presnovnega delovanja ali da bi se določila diagnoza bolezni." Zdravilo se

lahko uporablja le, če ima Dovoljenje za promet z zdravilom, ki ga proizvajalec pridobi na podlagi predloženih dokazov o oceni njegove varnosti, kakovosti in učinkovitosti. Vse troje pristojen organ redno preverja tudi po vstopu na tržišče. V Sloveniji je za zdravila pristojen organ JAZMP (Javna agencija za zdravila in medicinske pripomočke). Proizvodnja in preskušanje zdravila morata potekati v skladu z dobro proizvodno prakso (28, 29). V Sloveniji lahko trenutno v lekarnah in specializiranih prodajalnah kupimo le eno zdravilo s Q10, to je Fidi koencim 10 (30).

Prehranska dopolnila

V Pravilniku o prehranskih dopolnilih so prehranska dopolnila definirana kot "živila, katerih namen je dopolnjevati običajno prehrano." Vsebujejo lahko koncentrirane vire hranil ali drugih snovi s hranilnim ali fiziološkim učinkom, če je njihova varnost v prehrani znanstveno utemeljena (31). O učinkovitosti torej ne moremo govoriti, lahko pa zagotovimo ustrezno varnosti in kakovost izdelkov (27). Proizvajalci morajo zagotavljati vsebnost in stabilnost aktivnih snovi do konca roka uporabnosti (4). Uradni nadzor nad prehranskimi dopolnili izvaja Zdravstveni inšpektorat Republike Slovenije (32). Leta 2013 je bil ukinjen postopek prve prijave, kar pomeni, da Ministrstvo za zdravje več ne vodi seznama prehranskih dopolnil, ki so v prometu v Sloveniji (33).

Med letoma 2003 in 2013 je Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije dobilo več kot 50 novih prijav prehranskih dopolnil s Q10 (34). Nekateri izdelki imajo navedeno, da vsebujejo Q10 v reducirani ali oksidirani obliki. Q10 je pogosto del izdelkov z več različnimi aktivnimi snovmi, kot so vitamini (npr. vitamini E, C, D, B), selen ter ω -3 in ω -6-maščobne kisline. Večina izdelkov je v obliki mehkih kapsul, najdemo pa lahko tudi trde kapsule, tablete, šumeče tablete, sirupe itd. (35–44). Raznolikost prehranskih dopolnil s Q10 lahko vidimo v Preglednici I, kjer je predstavljeno nekaj prehranskih dopolnil s Q10, ki jih lahko kupimo v Sloveniji.

Preglednica I: Primeri prehranskih dopolnil s Q10, ki jih lahko kupimo v Sloveniji

Ime prehranskega dopolnila (vir)	Vrsta farmacevtske oblike	Navedena oblika in vsebnost Q10	Navedene druge aktivne snovi
Ars Pharmae Kardio3aktiv (35)	Mehke kapsule	Koencim Q10; 25 mg/kapsulo	Ribje olje (EPK, DHK), abigenol, vitamin B1, vitamin B6, folna kislina, vitamin B12, vitamin D3, vitamin E, vitamin K2
Blooms CoQ10 Aquacelle (36)	Kapsule	Ubidekarenon; 50 mg/kapsulo	-
Medilek Statinix (37)	Kapsule	Ubikinol; 100 mg/kapsulo	Vitamin E, vitamin K2, cink
NICApur mediBalance Stat (38)	Trde kapsule	Ubikinol; 30 mg/kapsulo	Magnezij, selen, niacin, vitamin B6, vitamin B1, vitamin B2, vitamin D
Phytogarda Vitadyn Gold (39)	Vrečke s praškom za pripravo napitka	Koencim Q10; 5 mg/vrečko	Vitamin B1, vitamin B2, vitamin B6, vitamin B12, biotin, pantotenska kislina, niacin, folna kislina, vitamin A, vitamin D3, vitamin C, vitamin E, magnezij, mangan, cink, selen, lutein, taurin
Sensilab Q10 koencim mladosti (40)	Šumeče tablete	Koencim Q10; 12 mg/šumečo tableto	Vitamin C, vitamin E, niacin, pantotenska kislina, biotin, vitamin B12, vitamin B6, vitamin B1, folna kislina
Supradyn® energija (41)	Filmsko obložene tablete	Koencim Q10; 4,5 mg/tableto	Vitamin C, niacin, vitamin E, pantotenska kislina, vitamin B6, riboflavin, tiamin, vitamin A, folna kislina, biotin, vitamin K, vitamin D, vitamin B12, kalcij, magnezij, železo, cink, mangan, baker, jod, selen, molibden
Terranova koencim Q10 (42)	Kapsule	Ubikinon; 30 mg/kapsulo	-
Valens Quvital Q10 (43)	Ustno pršilo	Koencim Q10; 50 mg/0,9 ml	Vitamin B1
Valens Quvital® Q10 Forte (44)	Sirup	Koencim Q10; 15 mg/ml	Vitamin B1, vitamin B2

Funkcionalna živila

To so živila, za katera imamo dokaze, da koristno vplivajo na naše telo, tako da izboljšajo naše zdravje in počutje ali zmanjšujejo tveganje za nastanek bolezni (45). Večinoma gre za živila, ki so jim dodali koristne sestavine, odvzeli škodljive sestavine ali spremenili lastnosti nekaterih sestavin. Izgled in uporaba sta enaka kot pri običajnih živilih, ki so del vsakodnevne prehrane. Pogosto so obogatena z vitamini, minerali, prehranskimi vlakninami, probiotiki, antioksidanti ipd. (45, 46). Pri Q10 so to največkrat mlečni izdelki (mleko, jogurti), ki so obogateni z vodotopno obliko Q10, kot je jogurtov napitek Ego Slim & Vital (8, 47).

Zaradi sestave in učinka na zdravje lahko proizvajalci teh živil uporabljajo zdravstvene trditve o lastnostih njihovega izdelka (46). Evropska komisija redno posodablja seznam zdravstvenih trditve s pogoji, pod katerimi jih lahko uporabljajo na živilih (33, 48). EFSA (Evropska agencija za varnost hrane) odobri predlagane trditve le na podlagi splošno sprejetih znanstvenih dokazov o vzročno-posledični povezavi prehranskega vnosa snovi in njenemu koristnemu učinku na zdravje ljudi (23). Trditve o vplivu prehranskega vnosa Q10 (ubikinona) niso odobrene, saj EFSA meni, da niso podprte z dovolj dokazi oz. so le ti pomanjkljivi (premajhen vzorec, nereprezentativnost populacije, premalo kliničnih študij). Omenjene trditve se nanašajo na prispevanje Q10 k normalni energijski presnovi, vzdrževanju normalnega krvnega tlaka, zaščiti DNA, proteinov in lipidov pred oksidativnimi poškodbami, prispevanju k normalnim kognitivnim funkcijam, normalnim krvnim koncentracijam holesterola in povečanju vzdržljivosti oz. telesne zmogljivosti (11, 23). Nekatere obrazložitve temeljijo na poročilu Znanstvenega odbora za hrano (ang. Scientific Committee for Food; danes EFSA) iz leta 1993, v katerem je zapisano, da vnos Q10 s hrano ni potreben, ker ga telo zdravega posameznika sintetizira samo v zadostnih količinah (23, 49). Danes vemo, da se biosinteza Q10 z leti zmanjšuje, kar lahko privede do povečane potrebne po vnosu Q10 s hrano (11).

NIJZ (Nacionalni inštitut za javno zdravje) poudarja, da nimamo dovolj podatkov za določitev zgornje meje dnevnega vnosa Q10 (11). JAZMP je izdelke s Q10, s katerimi presežemo dnevni odmerek 50 mg, opredelila kot zdravila. Odločitev je utemeljila z razlago, da se odmerki, večji od 50 mg, večinoma uporabljajo v terapevtske namene (50). Skladno s tem priporočilom NIJZ svetuje, da bolniki, ki potrebujejo večje odmerke Q10, te vnesejo v obliki zdravil, saj imajo takrat zagotovljeno varnost in kakovost izdelka (11). Meje največjega dovoljenega oz. priporočenega dnevnega vnosa Q10 s prehranskimi dopolnili se

med državami razlikujejo. V Avstraliji je to 150 mg, v Belgiji 200 mg, na Japonskem pa 300 mg (18). V literaturi najdemo podatke, da odmerke od 300 mg dnevno že uporabljajo pri zdravljenju različnih bolezni. Ljudem z različnimi dejavniki tveganja za pomanjkanje Q10 (npr. če so na terapiji s statini) priporočajo 100 mg dnevno. Na splošno naj bi zdravim ljudem do 40. leta starosti zadoščalo do 50 mg dnevno, po 40. letu starosti pa do 100 mg Q10 dnevno (4).

1.4 Stabilnost Q10

Q10 je rumen ali oranžen kristalni prašek brez vonja in okusa (51). Njegovo tališče je približno 48 °C. Je skoraj netopen v vodi, zelo težko topen v etanolu ter topen v acetonu in dietil etru. Ob daljši izpostavljenosti svetlobi se počasi razkraja in postane temnejši. Zato ga moramo shranjevati v zrakotesnih zaprtih vsebnikih, zaščitениh pred svetlobo (51, 52). Znižanje koncentracije Q10 v vzorcih so opazili po izpostavljenosti bazi in H₂O₂, medtem ko v kislem mediju ni prišlo do spremembe v koncentraciji Q10 (53). Na stabilnost ubikinona vplivajo reducenti, ki so prisotni v isti raztopini, njihova koncentracija in temperatura shranjevanja. Z višanjem temperature in koncentracije reducenta se niža koncentracija oQ10. Reducenti oz. antioksidanti so pogosto dodani različnim izdelkom s Q10, kjer bi lahko vplivali na pretvarjanje oQ10 v rQ10. V raztopinah, pripravljenih iz standardov, so opazili velik vpliv askorbinske kisline (AK) na redukcijo oQ10, medtem ko pri vitaminu E ni bilo sprememb (54). Kljub vsemu je ubikinon stabilnejša oblika Q10, saj se ubikinol na zraku, med rokovanjem oz. pripravo vzorca in analizo hitro pretvori v oQ10. Redoks delovanje Q10 lahko privede do napačnih rezultatov meritev, zato moramo čas priprave vzorca do analize čim bolj skrajšati in zagotoviti pogoje, ki zmanjšajo možnost oksidacije (22, 55, 56).

Številni izdelki zraven Q10 vsebujejo tudi druge snovi, ki lahko vplivajo na njegovo stabilnost (3). Na Japonskem so ugotovili, da nekatera prehranska dopolnila v obliki mehkih kapsul ali tekočih farmacevtskih oblik vsebujejo obe obliki Q10, čeprav imajo navedeno samo oQ10. Izdelki z obema oblikama Q10 so vsebovali tudi vitamin C in/ali vitamin E, ki bi lahko vplivala na redukcijo Q10. Da bi potrdili vpliv teh antioksidantov na stabilnost oQ10, so pripravili eksperimentalne formulacije: mehke kapsule (z različnimi kombinacijami Q10, vitamina C, vitamina E in različnim oljem kot podlago), trde kapsule in tekoči pripravek. Stabilnost pripravljenih formulacij so opazovali 9 mesecev. Do redukcije je prišlo v tekočem izdelku in mehkih kapsulah, medtem ko je v trdih kapsulah vsebnost oQ10 ostala nespremenjena ves čas raziskave. Največja redukcija je bila v tekočem izdelku.

Opazili so povezavo med stopnjo redukcije in vsebnostjo vitamina E ter žafranikinim oljem kot podlago. Redukcija je bila bistveno večja v izdelkih z žafranikinim oljem kot z oljnim oljem. V mehkih kapsulah z žafranikinim oljem je bila redukcija večja pri izdelku z več vitamina E, medtem ko vpliva količine vitamina C niso preučevali (57). Da vitamin C zmanjša delež ubikinona, so pokazale druge študije stabilnosti Q10. V mehkih kapsulah z navedeno oQ10 in vitaminom C so pri spremljanju stabilnosti pri povišani temperaturi in relativni vlažnosti opazili znižanje vsebnosti ubikinona in hkrati višanje vsebnosti ubikinola (54, 58). Prisotnost obeh oblik Q10 je z vidika kakovosti izdelka in njegove predstavitve uporabniku neustrezna in zavajajoča. Z vidika učinkovitosti pa je prisotnost rQ10 zaradi večje biološke uporabnosti celo primernejša (17, 57).

1.5 Kakovost izdelkov s Q10 za peroralno uporabo

Izdelki vsebujejo Q10 v eni izmed treh oblik: kristalni obliki ("surovi"), oljnih suspenzijah ali vodotopni obliki. Prve farmacevtske oblike s Q10 so vsebovale ubikinon v kristalih (npr. tablete, trde kapsule). Absorpcija Q10 iz teh izdelkov je zelo nizka, tudi če zmanjšamo velikost delcev, ker se Q10 v prebavnem traktu ne raztopi (4). Rezultati *in vitro* raztapljanja s simulacijo prebavnih pogojev so pokazali, da se pri farmacevtskih oblikah s Q10 v obliki praška raztopi do 5 % odmerka (15). Na absorpcijo Q10 iz prebavnega trakta zelo vplivajo pomožne snovi v farmacevtski obliki. Zato je bil naslednji korak priprava oljnih suspenzij s Q10 (npr. mehke kapsule), pri katerih je absorpcija večja kot pri kristalni obliki. Na to vplivajo pomožne snovi (emulgatorji) (4). Tudi maščobe oz. olja v farmacevtski obliki povečajo hitrost absorpcije (19). Pri nekaterih izdelkih so opazili, da je absorpcija celo večja pri farmacevtskih oblikah s sojinim oljem kot z emulgatorji (17). Pri suspenzijah Q10 je problem, da lahko Q10 v kapsuli kristalizira, kar zmanjša hitrost raztapljanja (57). Pri Q10 je absorpcija večja, če je koncentracija Q10 v micelih večja, kar dosežemo z izdelki, ki že imajo solubiliziran Q10. Največjo biološko uporabnost imajo torej izdelki s solubiliziranim Q10 (npr. v obliki kompleksov s ciklodekstrini, liposomi, z miceli, nanodisperzije), še posebej če so v obliki mehkih kapsul z oljem in ne tablet ali trdih kapsul (4, 15, 57). V Sloveniji so patentirali inkluzijski kompleks Q10 v β -ciklodekstrinu (Q10Vital®), ki je na voljo v tekoči obliki ali kot prašek. Zaradi vodotopnosti in dokazano večje biološke uporabnosti kot predhodne oblike Q10 to obliko Q10 uporabljajo številni proizvajalci funkcionalnih živil in prehranskih dopolnil v Evropi (59).

Pri nekaterih izdelkih je problem, da farmacevtska oblika ne razpade dovolj hitro. Pri mehkih

kapsulah, ki so najpogostejša farmacevtska oblika s Q10, je želatinska ovojnica pogosto debela. S tem se vzpostavi dobra zaščita Q10 pred kisikom in drugimi zunanjimi vplivi (večja stabilnost Q10), vendar lahko otežuje njeno razpadanje in s tem prepreči možnost raztapljanja učinkovine (57). Zaradi slabe topnosti Q10 je pomembno, da se ta čim prej oz. v velikem deležu sprosti iz farmacevtske oblike. Ker je čas za absorpcijo Q10 iz prebavnega trakta kratek, mora biti raztapljanje oz. tvorba micelov v tankem črevesu hitra (4, 10, 15). Pri kontroli kakovosti izdelkov je pomembno, da je vsebnost učinkovine v vnaprej določenih mejah. V Ameriški farmakopeji (USP) najdemo zahteve glede vsebnosti Q10 v kapsulah in tabletah. Kapsule z ubidekarenonom morajo vsebovati vsaj 90,0 % in največ 115,0 % navedene količine (2). Na Japonskem so s testom vsebnosti preverjali kvaliteto prehranskih dopolnil s primerljivimi zdravili brez recepta na njihovem tržišču. Pri zdravilih je bila vsebnost praktično enaka navedeni (99 – 100 %). Pri prehranskih dopolnilih je večina izdelkov vsebovala več kot 80 % navedenega Q10, le manjši delež je imelo vsebnost nižjo. Izdelkov z več kot 120 % navedene vsebnosti ni bilo (57). V drugi študiji so izmerili vsebnost Q10 58 prehranskih dopolnil, ki jih lahko kupimo v lekarnah v Sloveniji, Španiji in Belgiji ter na spletu. Ugotovljena vsebnost je bila med 0 in 165 % navedene vsebnosti. Polovica izdelkov (49 %) je imela vsebnost nižjo od 80 %, 5 % izdelkov pa je imelo vsebnost večjo od 130 % navedene. Torej je bilo veliko prehranskih dopolnil neustreznih kljub relativno širokemu intervalu (27).

Q10 je relativno zahtevna spojina, saj mora biti proces izdelave izdelkov prilagojen njegovim lastnostim (občutljivost na svetlobo in prisotnost kisika, lipofilnost, nizko tališče). To zviša ceno proizvodnje (57). Zato proizvajalci prehranskih dopolnil pogosto varčujejo s surovinami ali proizvodnjo poenostavijo, kar vodi v nestabilnost Q10. Oboje zniža kakovost izdelka. Najmanj nevaren vidik tega je zavajanje uporabnikov prehranskih dopolnil (27). Večji problem je varnost, saj zaradi nižje vsebnosti od navedene s takšnimi izdelki ne dosežemo pričakovanega učinka (50).

Uporaba prehranskih dopolnil narašča (27). Ljudje jih lahko hitro zamenjajo z zdravili, saj se prav tako nahajajo v farmacevtskih oblikah in uživajo v odmerjenih manjših količinskih enotah (28, 31). V slovenski raziskavi so ugotovili, da približno 60 % ljudi misli, da s prehranskimi dopolnili preprečujemo razvoj bolezni in da so odobrena s strani Ministrstva za zdravje. Približno 40 % jih verjame, da so namenjena zdravljenju in da Ministrstvo za zdravje spodbuja njihovo uporabo (60). Zato bi bilo smiselno tudi za prehranska dopolnila z

zakonom uvesti ostrejšje zahteve glede zagotavljanja kakovosti in varnosti, ki sta pri prehranskih dopolnilih pogosto vprašljivi (27).

1.6 Metode za merjenje vsebnosti Q10

Metode za ugotavljanje vsebnosti Q10 večinoma vključujejo reverznofazno (RP) tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z različnimi detektorji. Splošno uporabljeni so UV-VIS detektorji, uporabljamo pa še elektrokemijske detektorje (ECD) in masno spektrometrijo (MS) (61). ECD in MS so zelo občutljivi detektorji, zato so primerni za vzorce z nizko koncentracijo Q10, vendar so relativno zahtevni za uporabo. Z večino metod, zlasti z UV-VIS detekcijo, izmerimo vsebnost skupnega Q10 v vzorcu, z novejšimi metodami oz. prilagojeno pripravo vzorca pa lahko merimo tudi vsebnost rQ10 in/ali oQ10. Vsebnost posamezne oblike je še posebej pomembna pri bioloških vzorcih, saj z vsako obliko Q10 opišemo drugo stanje v telesu (55, 56).

Evropska farmakopeja v monografiji o ubidekarenonu za merjenje vsebnosti Q10 kot surovine navaja metodo RP tekočinske kromatografije z UV detektorjem (62). Pred kratkim se je še uporabljala metoda merjenja absorbance pripravljenega vzorca, pri kateri smo vsebnost izračunali s pomočjo znane specifične absorbance (52). Pri kontroli kakovosti izdelkov moramo uporabiti metode, ki so primerne za merjenje vsebnosti Q10 ob prisotnosti drugih analitov. USP vsebuje poglavje o prehranskih dopolnilih, v katerem je monografija o ubidekarenonu oz. Q10. Merjenje njegove vsebnosti v kapsulah in tabletah izvedemo s HPLC metodo z UV detektorjem. Vzorec za analizo pripravimo z ekstrakcijo Q10 iz kapsul, ki ji sledi redčenje z raztopino FeCl_3 v etanolu. Tako oksidiramo celoten Q10 in ugotovimo njegovo skupno vsebnost (2). Uradna metoda AOAC International (neodvisna neprofitna organizacija, ki se ukvarja z razvojem analiznih metod) za merjenje vsebnosti Q10 v končnih izdelkih in izhodnih materialih je podobna tisti iz USP, saj temelji na ekstrakciji Q10 iz vzorca in redčenju z raztopino FeCl_3 . Analizo izvedemo z RP-HPLC metodo z UV detektorjem. V sodelovanju z WHO (Svetovna zdravstvena organizacija) in FDA (Ameriška uprava za hrano in zdravila) so potrdili primernost te metode na različnih vrstah prehranskih dopolnil (mehkih in trdih kapsulah, žvečljivih tabletah) (63). V japonski študiji kvalitete prehranskih dopolnil so za merjenje vsebnosti Q10 uporabili HPLC metodo z ECD, s katero so izmerili vsebnost rQ10. Nato so vzorcem dodali raztopino NaBH_4 , da so ves Q10 reducirali in tako izmerili skupno vsebnost Q10 (57). Ker je Q10 pogosto v izdelkih, ki vsebujejo še druge aktivne snovi (npr. vitamine), je smiselno razviti metode, s katerimi lahko

hkrati izmerimo še vsebnost ostalih analitov v vzorcu. Najdemo lahko številne članke, v katerih so raziskovalci objavili na novo razvite ali optimizirane metode za merjenje vsebnosti Q10. V Preglednici II so našteje nekatere izmed teh.

Preglednica II: Primeri metod za merjenje vsebnosti Q10 v različnih vzorcih

Metoda (vir)	Vrsta vzorca	Oblika Q10	Sočasno vrednoteni analiti
RP-HPLC + UV detektor (64)	Plazma (heparin)	Q10	Koencim Q9
Denzitometrična HPTLC (53)	Tablete, kapsule	Q10	-
RP-HPLC + ECD (65)	Plazma (heparin)	rQ10, Q10	Koencim Q9
RP-HPLC + UV/VIS detektor (66)	Raztopine, mehke kapsule, tablete	rQ10, oQ10	Vitamini: A-palmitat, D3, E-acetat, K1, provitamin A
RP-HPLC + UV detektor (67)	Hibridni nanodelci	Q10	Simvastatin
RP-HPLC + UV detektor (68)	Tablete	Q10	Likopen
RP-HPLC + MS (56, 69)	Plazma	Q10	-
RP-UHPLC + MS/MS (70)	Tkivo	rQ10, oQ10	-
RP-UHPLC + MS/MS (55)	Plazma (heparin)	rQ10, oQ10	-
RP-HPLC + ECD (71)	Mišično tkivo	rQ10, oQ10	-
UV-spektrofotometrična metoda (72)	Tablete	Q10	Klomifen citrat
FT-IR spektrofotometrična metoda (73)	Farmacevtski izdelki	Q10	-
Kapilarna elektroforeza: elektrokinetična kromatografija + UV/VIS detektor (56, 74)	Plazma	Q10	-
Jedrska magnetnoresonančna (^1H NMR) spektroskopija (75)	Kapsule, tablete, tekoči pripravki	Q10	-
Voltametrična metoda (76)	Mehke kapsule	Q10	-
Titrimetrična metoda (77)	Trde kapsule (praški)	Q10	-

HPTLC ... tankoplastna kromatografija visoke ločljivosti

UHPLC ... tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti

FT-IR ... infrardeči spektrofotometer s Fourierovo transformacijo

2 NAMEN DELA

Na tržišču je veliko izdelkov za peroralno uporabo s Q10. Zaradi rezultatov novjših raziskav, ki kažejo, da je rQ10 boljša izbira za vnos Q10, je med njimi vedno več tistih z navedeno rQ10. Ker je rQ10 znana kot nestabilna oblika Q10, je potrebno prilagoditi postopek izdelave teh izdelkov, kar zviša njihovo ceno. Prevladujejo prehranska dopolnila, ki nimajo tako stroge zakonodaje preverjanja kakovosti, zato so ta pogosto neustrezna. V predpisih za preverjanje kakovosti izdelkov najdemo le kriterije o vsebnosti skupnega Q10. Ker si obliki Q10 nista enakovredni, je smiselno vrednotiti še vsebnost posamezne oblike Q10, da zagotovimo skladnost izdelka z njegovo predstavitvijo.

V okviru magistrske naloge želimo kvantitativno ovrednotiti vsebnost in stabilnost Q10 v različnih izdelkih s tremi različnimi metodami HPLC. Pregledali bomo, kateri izdelki za peroralno uporabo so na voljo v Sloveniji in izmed teh izbrali 10 (zdravilo in prehranska dopolnila), ki so v obliki mehkih ali trdih kapsul. Izbrali bomo tudi takšne, ki imajo navedeno, da vsebujejo samo eno obliko Q10 (oksidirano oz. reducirano). Nekateri med njimi bodo vsebovali še AK.

Preverili bomo, ali so izbrane metode primerne za merjenje vsebnosti Q10 v teh izdelkih, in jih optimizirali, če bo potrebno. Nato bomo izmerili vsebnost Q10 v izdelkih. Vrednotili bomo naslednje parametre: vsebnost skupnega Q10, oQ10 in rQ10, delež posameznih oblik glede na skupen Q10 in ujemanje z navedeno vsebnostjo Q10. Kvantitativno bomo vrednotili vsebnost oQ10, rQ10 in skupnega Q10 glede na navedene količine. Preveriti želimo, ali je rQ10, ki velja za nestabilno obliko, stabilna v izbranih izdelkih, ki naj bi vsebovali le to obliko Q10. Pokazati želimo, da AK, ki je prisotna v nekaterih izdelkih, zmanjša stabilnost oQ10. Iz rezultatov vsebnosti skupnega Q10 bomo s statističnim testom preverili, ali z uporabo teh analiznih metod dobimo primerljive rezultate vsebnosti skupnega Q10.

V zadnjem delu bomo izvedli pospešeno stabilnostno študijo pri temperaturi 40 °C in 75 % relativne vlažnosti, ki bo trajala 3 mesece. V časovnih točkah 2, 4, 8 in 12 tednov bomo spremljali enake parametre kot v prvem delu eksperimentalnega dela. Preveriti želimo, ali lahko ugotovitve o stabilnosti Q10 iz prvega dela potrdimo z rezultati pospešene stabilnostne študije, saj se pri ostrejših pogojih nestabilnost bolj izrazi.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Reagenti, topila in standard

- Acetonitril (ACN): C_2H_3N , MM = 41,05 g/mol, za HPLC, gradient grade, $\geq 99,9\%$ (Riedel-de Haën, Nemčija)
- Brezvodni etanol (EtOH): C_2H_5OH , MM = 46,07 g/mol, $\geq 99,9\%$, Ph. Eur. (Merck, Nemčija)
- Brezvodni železov(III) klorid: $FeCl_3$, MM = 162,20 g/mol, $\geq 98\%$ (Riedel-de Haën, Nemčija)
- Natrijev etilendiaminotetraacetat dihidrat (EDTA): $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$, MM = 372,24 g/mol, Ph. Eur. (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Koencim Q10: $C_{59}H_{90}O_4$, MM = 863,37 g/mol, delovni standard (Kaneka Corporation, Japonska); v obliki oQ10
- L-askorbinska kislina: $C_6H_8O_6$, MM = 176,12 g/mol, $\geq 99,0\%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Metanol (MeOH): CH_4O , MM = 32,04 g/mol, za HPLC, $\geq 99,9\%$ (Riedel-de Haën, Nemčija)
- Milli-Q® voda (MQ) oz. ultra čista voda (voda, pridobljena s sistemom Milli-Q®), Fakulteta za farmacijo
- Natrijev borohidrid: H_4BNa , MM = 37,83 g/mol, p.a., $\geq 96\%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- n-heksan: C_6H_{14} , MM = 86,18 g/mol, p.a., Ph. Eur., $\geq 99\%$ (Riedel-de Haën, Nemčija)
- Tetrahidrofuran (THF): C_4H_8O , MM = 72,11 g/mol, za HPLC, brez inhibitorja, $\geq 99,9\%$ (Riedel-de Haën, Nemčija)
- Železov(II) sulfat heptahidrat: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, MM = 278,02 g/mol, Ph. Eur., $\geq 99,5\%$ (Merck, Nemčija)

3.1.2 Izdelki s Q10

V Preglednici III so predstavljeni izdelki, ki smo jih testirali med 1. 4. 2017 in 31. 8. 2017. Povzemamo podatke, ki so navedeni na zunanji ovojnini izdelka oz. navodilu za uporabo.

Preglednica III: Podatki o testiranih izdelkih

Oznaka izdelka	Ime in vrsta izdelka; farmacevtska oblika	Navedena vsebnost in oblika Q10 v kapsuli	Navedena vsebnost pomožnih snovi v kapsuli	Datum izteka roka uporabnosti; serija
A	MARIFIT Koencim Q10 ^{DE} ; PD; mehke kapsule	50 mg ubidekarena	rastlinska olja (sončnic, kokosa in palmovih jedrc), glicerol, modificirani koruzni škrob, karagenan, silicijev dioksid, voda, 6 mg vit. E (D- α -tokoferol), železov oksid, natrijev karbonat, 2,5 μ g vit. D ₃ (holekalciferol), DL-alfa-tokoferol	09. 2017; 664-003
B	Dr. Böhm® Omega 3 complex; PD; mehke kapsule	30 mg koencima Q10	olje hladnovodnih rib (vsebuje 800 mg ω -3 maščobnih kislin, od tega 408 mg EPK in 276 mg DHK), želatina, glicerol, 12 mg vit. E (DL- α -tokoferilacetat), železov oksid, 10 μ g vit. D (holekalciferol)	30. 06. 2018; 160311
C	now CoQ10 50 mg; PD; mehke kapsule	50 mg ubikinona	olje riževih otrobov, želatina, glicerol, 20 mg vit. E (d- α -tokoferilacetat), 70 μ g selena (L-selenometionin), voda, rumeni čebelji vosek, lecitin, rožičevce	02. 2021; 19854730625
D	Fidi koencim 10®; BRp l+p; mehke kapsule	30 mg ubidekarena	24 mg vit. E (vseracemni- α -tokoferilacetat), AK, betakaroten, selen v medicinskem kvasu, suhi kvas, rafinirano, hidrogenirano in delno hidrogenirano sojino olje, maščoba iz surovega masla, koruzno olje, rumeni vosek, lecitin (polnilo), želatina, 85-odstotni glicerol, železov oksid, titanov dioksid (ovojnica)	D1: 10. 2017; A12849-01 D2: 01. 2017; A10526-01 D3: 07. 2016; A9736-01

E	MorEPA GOLD SMART FATS®; PD; mehke kapsule	30 mg koencima Q10	koncentrirano ribje olje iz globokomorskih rib (vsebuje 720 mg ω -3 maščobnih kislin, od tega 500 mg EPK in 150 mg DHK), ribja želatina, mono- in digliceridi, glicerol, 80 mg vit. C, 15 mg cinka (cinkov citrat), 5 mg hidroksitirosola (izvleček plodu oljke), oljčno olje, naravna aroma pomaranče, železov oksid, mešanica izvlečka rožmarina in tokoferolov, 400 μ g folne kisline, 20 μ g izvlečka eteričnega olja česna, 2,5 μ g vit. B ₁₂ (cianokobalamin)	09. 2018; 608015614
F	KOENCIM Q10 30 mg z antioksidanti; PD; trde kapsule	30 mg koencima Q10	mikrokristalična celuloza, modificirani škrob (maltodekstrin, β -ciklodekstrin), želatina, titanov dioksid, rumeni železov oksid, rdeči železov oksid, črni železov oksid, 40 mg vit. C (L-AK), 16 mg vit. E (DL- α -tokoferilacetat), kalcijev karbonat, 14 μ g selen (natrijev selenat)	06. 2018; L04690616
G	imuno BC plus; PD; trde kapsule	10 mg koencima Q10	226,7 mg β -(1,3/1,6)-D-glukana, želatina, 90 mg vit. C (L-AK), 10 mg ekstrakta korenine ginsenga, 7,5 mg cinka (cinkov glukonat)	03. 2017; 004105
H	Bio-Qinon® Aktivni Q10 30 mg z vit. C; PD; mehke kapsule	30 mg ubikinona Q10	palmino olje, želatina, glicerol, 25 mg vit. C (L-AK), amonijev karamel, prečiščena voda, silicijev dioksid, titanov dioksid	06. 2019; 1652115

I	BioAktivni Q10 Uniqinol® z vit. C; PD; mehke kapsule	30 mg ubikinola	kokosovo olje, želatina, glicerol, amonijev karamel, prečiščena voda, 12 mg vit. C, AK prep., silicijev dioksid, titanov dioksid, zmes tokoferolov	19. 10 2018; L1650317
J	now Ubiquinol CoQH-CF™; PD; mehke kapsule	50 mg ubikinola	D-limonen, želatina, glicerol, voda, kaprilna kislina, karamel, kaprinska kislina, α -lipoična kislina	03. 2018; 1998244 1410

PD ... prehransko dopolnilo

BRp l+p ... zdravilo, ki se izdaja brez recepta v lekarnah in specializiranih prodajalnah

vit. ... vitamin

3.1.3 Naprave in pribor

- Analitska tehtnica Excellence Plus (Mettler Toledo, Švica)
- Analitski sistem HPLC:
 - Agilent 1100-1200 series HPLC (Agilent Technologies, ZDA): kvarтерна črpalka, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, variabilni UV-VIS detektor
 - Kolona: Luna C18 150×4,6 mm, 5 μ m (Phenomenex, ZDA)
 - Predkolona: Luna C18 4×3,0 mm (Phenomenex, ZDA)
 - Programska oprema: ChemStation
- Avtomatske pipete: 20 - 200 μ l, 100 - 1000 μ l (Eppendorf, Nemčija)
- Centrifuga Centric 400R (Tehtnica, Slovenija)
- Eksikator
- Hladilnik (Gorenje, Slovenija)
- Klimatska komora VC 4034 (Vötsch, Nemčija)
- Sistem za pripravo MQ: Milli-Q® A10 Advantage (Millipore Corporation, ZDA)
- Steklovina: čaše, čolnički za tehtanje, merilne bučke, merilni valji, zamaški
- Stresalnik Vibromix 10 (Tehtnica, Slovenija)
- Stresalnik Vibromix 403 EVT (Tehtnica, Slovenija)
- TurboVap LV (Caliper, ZDA)
- Ultrazvočna kadička Sonis 4 (Iskra, Slovenija)
- Ostalo: aluminijasta folija, centrifugirke (15 ml, 50 ml), kapalke, mikrocentrifugirke (1,5 ml, 2 ml), nastavki za pipete, Parafilm M, pinceta, skalpel, spatule, škarje, vialne, vialne

zamaški za vialo, zaščitne rokavice

3.2 Metode

3.2.1 Priprava mobilne faze, standarda in drugih raztopin

Mobilna faza

Združili smo ACN, MQ in THF v volumskem razmerju 50:5:45. Pred uporabo na sistemu HPLC smo mobilno fazo 10 minut sonicirali.

0,1 M raztopina EDTA v MQ

V tehtalni čolniček smo natehtali približno 1860 mg EDTA, jo kvantitativno prenesli v 50-ml merilno bučko in dopolnili z MQ do oznake. Sonicirali smo 10 minut.

Raztopina AK v ACN

V tehtalni čolniček smo natehtali potrebno količino AK, tako da je bilo v raztopini za analizo na sistemu HPLC, pripravljeni po metodi z redukcijo (opisana v poglavju 3.2.2), molsko razmerje Q10:AK = 1:5. Npr. za redukcijo izhodne raztopine Q10 s koncentracijo 250 mg/l smo potrebovali raztopino AK v ACN s koncentracijo 255 mg/l. Pripravili smo jo tako, da smo natehtali približno 6,4 mg AK, jo kvantitativno prenesli v 25-ml merilno bučko in dopolnili do oznake z ACN.

Raztopine Fe^{3+} v ACN

Za pripravo 0,1 % raztopine FeCl_3 (0,03 % raztopine Fe^{3+}) smo v tehtalni čolniček natehtali 25 mg FeCl_3 , ga kvantitativno prenesli v 25-ml merilno bučko in dopolnili do oznake z ACN. Iz te raztopine smo pripravili 0,01 % raztopino FeCl_3 (0,003 % raztopino Fe^{3+}) in sicer tako, da smo odpipetirali 2 ml pripravljene raztopine v 20-ml merilno bučko in dopolnili do oznake z ACN.

Za pripravo 0,1 % raztopine Fe^{3+} (0,3 % raztopine FeCl_3) smo v tehtalni čolniček natehtali 72,5 mg FeCl_3 , ga kvantitativno prenesli v 25-ml merilno bučko in dopolnili do oznake z ACN. 0,001 % raztopino Fe^{3+} smo pripravili tako, da smo v 20-ml merilno bučko odpipetirali 0,2 ml 0,1 % raztopine Fe^{3+} in dopolnili do oznake z ACN. 0,0001 % raztopino Fe^{3+} smo pripravili tako, da smo v 20-ml merilno bučko odpipetirali 2 ml 0,001 % raztopine Fe^{3+} ter dopolnili do oznake z ACN.

0,01 % raztopina Fe^{3+} v EtOH

V tehtalni čolniček smo natehtali 29 mg FeCl_3 , ga kvantitativno prenesli v 100-ml merilno bučko in dopolnili do oznake z brezvodnim EtOH.

0,01 % raztopina Fe^{2+} v ACN

V tehtalni čolniček smo natehtali 12,4 mg $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, ga kvantitativno prenesli v 25-ml merilno bučko, dopolnili do oznake z ACN in sonicirali 10 minut.

Raztopina standarda Q10

V tehtalni čolniček smo natehtali določeno količino standarda Q10, ga kvantitativno prenesli v 25-ml bučko in dopolnili do oznake z n-heksanom. Npr. za pripravo raztopine Q10 s koncentracijo 250 mg/l smo natehtali 6,25 mg Q10 in ga raztopili v 25-ml merilni bučki. Bučko s pripravljeno raztopino smo ovili s parafilmom in jo shranili v hladilniku do 1 tedna. Pred uporabo smo počakali, da se je uravnala na sobno temperaturo.

3.2.2 Optimizacija analiznih metod

Izbrali smo 3 metode za merjenje vsebnosti Q10, ki so bile predhodno razvite v laboratoriju. Podrobneje so predstavljene v nadaljevanju. Vse imajo skupen postopek ekstrakcije Q10 iz kapsule, razlikujejo pa se v nadaljnji pripravi vzorca za analizo na sistemu HPLC.

Najprej smo z vsemi tremi metodami izmerili vsebnost skupnega Q10 v izdelku D3. Po postopku *Ekstrakcije Q10 iz kapsule* smo pripravili raztopino iz ene kapsule izdelka D3, iz katere smo nato z vsako metodo pripravili vzorec za analizo. Vsak vzorec smo pripravili v 3 paralelah.

Ekstrakcija Q10 iz kapsule

Mehko kapsulo na tehtalnem čolničku s skalpelom prerežemo na 2 dela in vso vsebino skupaj z ovojnico kvantitativno prenesemo v 100-ml merilno bučko. Trdo kapsulo odpremo in vso vsebino skupaj z obema deloma ovojnice kvantitativno prenesemo v 100-ml merilno bučko.

Bučko dopolnimo z n-heksanom do približno $\frac{3}{4}$ in damo v ultrazvočno kadičko za 10 minut. Nato jo damo na stresalnik za 20 minut. Po stresanju dopolnimo do oznake z n-heksanom, dobro pretresemo in del vzorca 10 minut centrifugiramo pri 25 °C in 3200 rpm (obratov na minuto).

Metoda za merjenje posamezne oblike Q10 (metoda P)

V mikrocentrifugirko odpipetiramo 500 μ l heksanske faze in jo sušimo pod tokom dušika pri 40 °C do suhega (15 minut). Suhemu ostanku dodamo 2 ml ACN in soniciramo 2 minuti, nato še vorteksiramo 30 s. Pripravljen vzorec prenesemo v vialo in analiziramo.

Metoda z oksidacijo (metoda O)

V mikrocentrifugirko odpipetiramo 500 μ l heksanske faze in jo sušimo pod tokom dušika pri 40 °C do suhega (15 minut). Suhemu ostanku dodamo 2 ml 0,01 % raztopine FeCl₃ v ACN (0,003 % Fe³⁺). Soniciramo 2 minuti, nato vorteksiramo 30 s. Pripravljen vzorec prenesemo v vialo in analiziramo.

Po pregledu rezultatov smo metodo O optimizirali. Uporabili smo raztopino izdelka D3, pripravljeno po postopku *Ekstrakcije Q10 iz kapsule*. V Preglednici IV so zbrani podatki o parametrih, ki smo jih spreminjali. Raztopine smo pripravili v 4 paralelah.

Preglednica IV: Parametri optimizacije metode O

Topilo	Koncentracija Fe-ionov [%]	Koncentracija FeCl ₃ oz. FeSO ₄ ×7H ₂ O [%]	Vir Fe-ionov
ACN	0,0001	0,0003	FeCl ₃
ACN	0,001	0,003	FeCl ₃
ACN*	0,003*	0,01*	FeCl ₃ *
ACN	0,03	0,1	FeCl ₃
ACN	0,1	0,3	FeCl ₃
ACN	0,01	0,05	FeSO ₄ ×7H ₂ O
EtOH	0,01	0,03	FeCl₃

* izhodni parametri

V nadaljevalnem delu smo uporabljali **optimizirano metodo O**:

V mikrocentrifugirko odpipetiramo 500 μ l heksanske faze in jo sušimo pod tokom dušika pri 40 °C do suhega (15 minut). Suhemu ostanku dodamo 2 ml 0,01 % raztopine Fe³⁺ (0,03 % FeCl₃) v EtOH. Soniciramo 2 minuti, nato še vorteksiramo 30 s. Pripravljen vzorec prenesemo v vialo in analiziramo.

Metoda z redukcijo (metoda R)

V centrifugirko natehtamo NaBH_4 , jo zaščitimo pred svetlobo z aluminijasto folijo in vanjo odpipetiramo 2 ml heksanske faze. Maso reducenta preračunamo za vsak izdelek posebej. Pri tem upoštevamo predpis, ki pravi, da za 2 ml vzorca s koncentracijo 250 mg/l Q10 uporabimo 2,5 mg NaBH_4 . Npr. za kapsulo, ki vsebuje 30 mg Q10, raztopljeno v 100-ml bučki, natehtamo 3 mg reducenta.

Nato dodamo 1 ml MeOH, vorteksiramo 3 minute in pustimo stati 5 minut. Dodamo 1 ml 0,1 M raztopine EDTA v MQ in vorteksiramo 30 s. Sledi centrifugiranje pri 25 °C in 4000 g, ki traja 3 minute. V mikrocenrifugirko odpipetiramo 500 µl heksanske faze z rQ10 in sušimo pod tokom dušika pri 40 °C do suhega (15 minut). Suhemu ostanku dodamo 1 ml raztopine AK v ACN. Soniciramo 2 minuti, nato pa še vorteksiramo 30 s. Pripravljen vzorec prenesemo v vialo in takoj analiziramo.

Po pregledu rezultatov smo metodo R optimizirali. Pri optimizaciji smo namesto raztopine, ki smo jo dobili po postopku *Ekstrakcije Q10 iz kapsule*, uporabili raztopino standarda Q10 in z njo delali tako, kot je opisano v postopku metode R. V Preglednici V so predstavljeni parametri, ki smo jih spreminjali. Delali smo v 2 paralelah.

Preglednica V: Parametri optimizacije metode R

Koncentracija Q10 [mg/l]	Masa NaBH_4 [mg]	Volumen MeOH = volumen 0,01 M raztopine EDTA [ml]	Topilo za raztapljanje suhega ostanka
250*	2,5*	1*	AK v ACN*
250	10	4	AK v ACN
1000	10	4	AK v ACN
500	5	1	AK v ACN
250	2,5	1	ACN

* izhodni parametri

V nadaljevalnem delu smo uporabljali **optimizirano metodo R**:

V centrifugirko natehtamo NaBH_4 , jo zaščitimo pred svetlobo z aluminijasto folijo in vanjo odpipetiramo 2 ml heksanske faze. Maso reducenta preračunamo za vsak izdelek posebej. Pri tem upoštevamo predpis, ki pravi, da za 2 ml vzorca s koncentracijo 250 mg/l Q10 uporabimo 2,5 mg NaBH_4 . Npr. za kapsulo, ki vsebuje 30 mg Q10, raztopljeno v 100-ml bučki, natehtamo 3 mg reducenta.

Nato dodamo 1 ml MeOH, vorteksiramo 3 minute in pustimo stati 5 minut. Dodamo 1 ml 0,1 M raztopine EDTA v MQ in vorteksiramo 30 s. Sledi centrifugiranje pri 25 °C in 4000 g, ki traja 3 minute. V mikrocentrifugirko odpipetiramo 500 µl heksanske faze z rQ10 in sušimo pod tokom dušika pri 40 °C do suhega (15 minut). Suhemu ostanku dodamo 1 ml ACN. Soniciramo 2 minuti, nato pa še vorteksiramo 30 s. Pripravljen vzorec prenesemo v vialo in takoj analiziramo.

Kromatografski pogoji za kvantitativno vrednotenje vsebnosti rQ10, oQ10 in skupnega Q10:

- kolona: Luna C18 150×4,6 mm, 5 µm
- predkolona: Luna C18 4×3,0 mm
- mobilna faza: ACN:THF:MQ = 50:45:5 (V/V/V)
- pretok mobilne faze: 1 ml/min
- temperatura kolone: 25 °C
- valovna dolžina detekcije: 280 nm
- volumen injiciranja: 20 µl
- temperatura avtomatskega vzorčevalnika: 25 °C

Retencijski čas rQ10 je bil približno 6,7 minute, retencijski čas oQ10 pa približno 7,2 minute. Čas analize je bil 10 minut.

3.2.3 Vrednotenje instrumentalne HPLC metode

Priprava raztopin za vrednotenje instrumentalne HPLC metode

Za analizo oQ10 smo pripravili izhodno raztopino standarda Q10 (vsebuje samo oQ10) v n-heksanu s koncentracijo 225 mg/l, ki je predstavljala 100 %. Nato smo izhodno raztopino ustrezno redčili z n-heksanom v mikrocentrifugirke, kot je predstavljeno v Preglednici VI. Pripravljene raztopine smo sušili pod tokom dušika pri 40 °C do suhega (15 minut). Posušnim ostankom smo dodali 1 ml ACN, jih sonicirali 2 min, nato pa še vorteksirali 30 s. Raztopine smo prenesli v vialo in analizirali. Kontrolne vzorce različnih koncentracij (QC_H, QC_M in QC_L) smo pripravili v 3 paralelah.

Preglednica VI: Priprava raztopin z oQ10 za vrednotenje instrumentalne metode

Koncentracija oQ10 [%]	Koncentracija oQ10 v raztopini za analizo [mg/l]	Volumen odpipetirane raztopine oQ10 s koncentracijo 225 mg/l [μ l]	Volumen odpipetiranega n-heksana [μ l]
100	225	1000	0
90 (QC_H)	203	900	100
80	180	800	200
60	135	600	400
50	113	500	500
40 (QC_M)	90	400	600
30	68	300	700
20 (QC_L)	45	200	800
10	23	100	900
5	11	50	950

QC vzorce smo pripravili v 3 paralelah

Za analizo rQ10 smo pripravili izhodno raztopino standarda Q10 (vsebuje samo oQ10) v n-heksanu s koncentracijo 200 mg/l. Izvedli smo redukcijo izhodne raztopine po postopku optimizirane metode R. Uporabili smo sorazmerno večje količine reagentov: 6 ml izhodne raztopine standarda Q10 v n-heksanu s koncentracijo 200 mg/l, 6 mg NaBH₄, 3 ml MeOH in 3 ml 0,1 M raztopine EDTA v MQ. V mikrocentrifugirke smo odpipetirali različne volumne heksanske faze z rQ10, kot je navedeno v Preglednici VII, in jih sušili pod tokom dušika pri 40 °C do suhega (15 minut). Posušeni ostankom smo dodali 1 ml ACN, tako da smo dobili raztopine rQ10 z ustreznimi koncentracijami, ki so navedene v Preglednici VII. Raztopine smo sonicirali 2 minuti, nato pa še vorteksirali 30 s. Pripravljene vzorce smo prenesli v viala in jih takoj analizirali. Kontrolna vzorca (QC_M in QC_L) smo pripravili v 3 paralelah.

Preglednica VII: Priprava raztopin z rQ10 za vrednotenje instrumentalne metode

Koncentracija rQ10 [%]	Koncentracija rQ10 v raztopini za analizo [mg/l]	Volumen odpipetirane raztopine rQ10 s koncentracijo 200 mg/l [μ L]
100	200	1000
75	150	750
63	125	625

50 (QC _M)	100	500
38	75	375
25	50	250
13 (QC _L)	25	125
5	10	50

QC vzorce smo pripravili v 3 paralelah

Selektivnost

V kromatografski sistem smo injicirali raztopine, ki smo jih uporabili v zadnjem koraku priprave vzorcev za analizo (ACN, EtOH), raztopino standarda oQ10 v ACN in raztopino reduciranega standarda Q10 v ACN. Njihove kromatograme smo prekrili in preverili, ali so pri retencijskih časih obeh oblik Q10 prisotne interference.

Linearnost

Določili smo umeritveno premico odvisnosti odziva analita (AUC - površina pod kromatografskim vrhom) od njegove koncentracije, posebej za oQ10 in rQ10. Kot mejo sprejemljivosti smo postavili $R^2 \geq 0,999$.

Točnost

Za določanje točnosti smo uporabili kontrolne vzorce (QC) različnih koncentracij. Za vrednotenje točnosti oQ10 smo pripravili QC vzorce treh različnih koncentracij (20 %, 40 % in 90 % izhodne raztopine), za vrednotenje točnosti rQ10 pa QC vzorca dveh koncentracij (13 % in 50 % izhodne raztopine). Priprava vzorcev je podrobneje opisana zgoraj ter v Preglednicah VI in VII. Vsak QC vzorec smo pripravili v 3 paralelah. Točnost smo izračunali po Enačbi 1 za vsako obliko Q10 posebej. Za mejo sprejemljivosti smo postavili 100 ± 5 %.

Enačba 1

$$\text{Točnost [\%]} = \frac{C_{\text{izračunana}}}{C_{\text{nominalna}}} \times 100 \%$$

$C_{\text{izračunana}}$... koncentracija Q10, izračunana iz enačbe umeritvene premice (Sliki 2 in 3)

$C_{\text{nominalna}}$... dejanska koncentracija Q10 v raztopini

Natančnost

Natančnost smo določali na nivoju znotraj-dnevne ponovljivosti, ki smo jo izrazili z relativnim standardnim odklonom (RSD). Uporabili smo rezultate QC vzorcev, ki smo jih

uporabili že pri določanju točnosti (opisano zgoraj). Vsak QC vzorec smo pripravili v 3 paralelah. RSD smo izračunali po Enačbi 8, zapisani v poglavju 3.4.1. Za mejo sprejemljivosti smo postavili $RSD \leq 5\%$.

3.3 Vrednotenje vsebnosti in stabilnosti Q10 v izdelkih

3.3.1 Vsebnost Q10 v izdelkih

V skladu s postopkom *Ekstrakcije Q10 iz kapsule*, opisanim v poglavju 3.2.2, smo iz vsakega izmed 10 izbranih izdelkov (med izdelki D smo testirali izdelek D1) pripravili 3 raztopine, vsako iz 1 enote (kapsule) posameznega izdelka. Nato smo iz vsake raztopine pripravili vzorec z metodama P in O (opisani v poglavju 3.2.2) in ga analizirali na sistemu HPLC. Vsak vzorec smo pripravili v 3 paralelah.

Iz vsake meritve vzorca smo izračunali 3 različne vsebnosti Q10 in sicer vsebnost oQ10, rQ10 in skupnega Q10. Vsebnost oQ10 in rQ10 smo izračunali s pomočjo enačb umeritvenih premic, ki smo ju določili pri preverjanju linearnosti instrumentalne metode (enačbi sta navedeni na Slikah 2 in 3 v poglavju 4.2). Izrazili smo jo tako, kot je navedena na ovojnicah izdelkov (masa Q10 v mg v 1 kapsuli). Enačbo 2 smo uporabili za izračun vsebnosti oQ10, Enačbo 3 pa za izračun vsebnosti rQ10. Pri metodi R je bil zaradi drugačnega postopka priprave vzorca drugačen faktor redčenja. Vsebnost skupnega Q10 smo izračunali z Enačbo 4, tako da smo sešteli vsebnosti obeh oblik Q10, izračunanih iz rezultatov meritve istega vzorca (iz Enačb 2 in 3).

Enačba 2

$$\text{vsebnost oQ10} \left[\frac{\text{mg}}{\text{kapsulo}} \right] = \frac{AUC_o + 20,182}{18,337} \times F_R$$

AUC_o ... površina pod kromatografskim vrhom oQ10

F_R ... faktor redčenja; metodi P in O: $F_R = 0,4$; metoda R: $F_R = 0,2$

Enačba 3

$$\text{vsebnost rQ10} \left[\frac{\text{mg}}{\text{kapsulo}} \right] = \frac{AUC_r + 0,4495}{3,6219} \times F_R$$

AUC_r ... površina pod kromatografskim vrhom rQ10

F_R ... faktor redčenja; metodi P in O: $F_R = 0,4$; metoda R: $F_R = 0,2$

Enačba 4

$$\text{vsebnost skupnega Q10} \left[\frac{\text{mg}}{\text{kapsulo}} \right] = \text{vsebnost oQ10} + \text{vsebnost rQ10}$$

Vsebnosti Q10 smo uporabili za izračun povprečij (AVE) in RSD, kar je podrobneje opisano v poglavju 3.4 Statistična obdelava podatkov. Za primerjavo vsebnosti oQ10, rQ10 in skupnega Q10 z navedeno vsebnostjo Q10 v testiranih izdelkih smo uporabili povprečje vsebnosti vzorcev, pripravljenih z metodo P iz različnih enot (kapsul) istega izdelka (Enačbi 11 in 13). Ujemanje vsebnosti Q10 z navedeno smo izrazili z deležem vsebnosti Q10 glede na navedeno vsebnost. Za vsak izdelek smo izračunali 2 različna deleža. Z Enačbo 5 smo izračunali ujemanje izmerjene vsebnosti tiste oblike Q10, ki je bila navedena na ovojnini izdelka. Z Enačbo 6 smo izračunali ujemanje izmerjene vsebnosti skupnega Q10. Rezultate smo vrednotili s kriteriji, zapisanimi v USP, po katerih mora biti vsebnost Q10 v mehkih in trdih kapsulah med 90,0 % in 115,0 % navedene vrednosti (2).

Enačba 5

$$\text{Delež navedene oblike Q10 [\%]} = \frac{AVE}{\text{navedena vsebnost}} \times 100 \%$$

AVE ... povprečje vsebnosti oQ10 oz. rQ10 vzorcev, pripravljenih iz raztopin istega izdelka (Enačba 13)

navedena vsebnost ... vsebnost Q10, ki je navedena na ovojnini izdelka (Preglednica III)

Enačba 6

$$\text{Delež skupnega Q10 [\%]} = \frac{AVE_S}{\text{navedena vsebnost}} \times 100 \%$$

AVE_S ... povprečje vsebnosti skupnega Q10 vzorcev, pripravljenih iz raztopin istega izdelka (Enačba 11)

navedena vsebnost ... vsebnost Q10, ki je navedena na ovojnini izdelka (Preglednica III)

3.3.2 Primerjava analiznih metod

Za primerjavo analiznih metod smo izbrali 6 izdelkov z različnimi vsebnostmi oQ10 in rQ10. Razdelili smo jih v 3 skupine:

- visoka vsebnost oQ10: izdelka A in C

- srednja vsebnost oQ10 in rQ10: izdelka B in D1
- nizka vsebnost oQ10 oz. visoka vsebnost rQ10: izdelka I in J

Ker smo vsebnost vsem 6 izbranim izdelkom že izmerili z metodama P in O (opisano v poglavju 3.3.1), smo za primerjavo analiznih metod uporabili kar iste podatke (zbrani v poglavju 4.3 Vsebnost Q10 v izdelkih). Iz vsake izmed treh pripravljenih raztopin iz različnih enot posameznega izdelka, ki smo jih pripravili za ugotavljanje vsebnosti Q10 (opisano v poglavju 3.3.1), smo pripravili še vzorce z metodo R (opisana v poglavju 3.2.2), vsakega v 2 paralelah. Analizne metode smo primerjali s statističnim testom, opisanim v poglavju 3.4.2. Dodatno smo preverili ponovljivost priprave vzorca (poglavje 3.4.2; RSD_M – Enačba 10).

Izbrali smo en izdelek iz vsake skupine, kateremu smo merili vsebnost skupnega Q10 z vsemi 3 metodami tudi v naslednjih časovnih točkah pospešene stabilnostne študije (opisano v poglavju 3.3.3), da bi dodatno potrdili enakovrednost uporabljenih metod za izračun vsebnosti skupnega Q10.

3.3.3 Stabilnost Q10 v izdelkih

Povprečja vsebnosti skupnega Q10 v izbranih izdelkih, ki smo jih izmerili oz. izračunali v prvem delu naloge (AVE_s - Enačba 11; rezultati so v poglavju 4.3), smo uporabili kot prvo oz. izhodiščno časovno točko pospešene stabilnostne študije (0 tednov). Po opravljenih meritvah smo izdelke v njihovi originalni primarni in sekundarni ovojnini postavili v klimatsko komoro, v kateri je bila nastavljena temperatura 40 °C in relativna vlažnost 75 %. Iz vsakega izdelka smo v vsaki naslednji časovni točki (2, 4, 8 in 12 tednov) po postopku *Ekstrakcije Q10 iz kapsule*, opisanem v poglavju 3.2.2, pripravili 2 raztopini, vsako iz 1 kapsule istega pripravka. Iz teh raztopin smo pripravili vzorce z metodama O in P, trem izdelkom pa tudi z metodo R (izbrali smo po en izdelek iz vsake skupine: A, D1 in J). Vsak vzorec smo pripravili v 3 paralelah. Vsebnosti oQ10, rQ10 in skupnega Q10 smo izračunali z Enačbami 2, 3 in 4, iz teh pa nato še povprečja za vsak izdelek (AVE_s – Enačba 11, AVE – Enačba 13). Izračunali smo tudi deleže Q10 glede na navedene vsebnosti v izdelkih z Enačbama 5 in 6.

V vsaki časovni točki smo preverili stabilnost obeh oblik Q10 in skupnega Q10. Stabilnost Q10 smo izrazili kot delež vsebnosti Q10 v vsaki časovni točki glede na začetno vsebnost Q10, ki smo jo izmerili v izhodiščni časovni točki. Uporabili smo Enačbo 7.

Enačba 7

$$\text{Delež vsebnosti Q10 (stabilnost)}[\%] = \frac{\text{AVE}_{Q10} \text{ v posamezni časovni točki}}{\text{AVE}_{Q10} \text{ v 1. časovni točki}} \times 100 \%$$

AVE_{Q10} ... povprečje vsebnosti Q10 vzorcev, pripravljenih iz raztopin istega izdelka;
 za vrednotenje skupnega Q10: AVE_s (povprečje vsebnosti skupnega Q10; Enačba 11)
 za vrednotenje oQ10 oz. rQ10: AVE (povprečje vsebnosti oQ10 oz. rQ10; Enačba 13)

Dodatno smo želeli preveriti, ali se vsebnost oQ10 v izdelkih z AK zniža tudi pri shranjevanju v predvidenih pogojih shranjevanja (pri sobni temperaturi in relativni vlažnosti). Zato smo analizirali še 2 izdelka D (D2, D3), ki sta bila iz drugih serij proizvodnje in sta v času testiranja imela pretečen rok uporabnosti. Vzorce iz teh izdelkov smo pripravili na enak način kot vzorce ostalih izdelkov v pospešeni stabilnostni študiji (opisano zgoraj). Tako smo dobili podatke o vsebnosti Q10 v 3 enakih izdelkih z različnim datumom izdelave (D1, D2 in D3; rok uporabnosti je 2 leti (78)). Izdelek D1, kateremu smo že izmerili vsebnost Q10 v izhodiščni časovni točki (poglavje 3.3.1), je bil v času testiranja še znotraj roka uporabnosti (6 mesecev do njegovega izteka oz. 18 mesecev po izdelavi), izdelek D2 je imel rok uporabnosti pretečen za 6 mesecev (30 mesecev po izdelavi), izdelek D3 pa za 9 mesecev (33 mesecev po izdelavi). V primerjavo smo vključili še rezultate vsebnosti izdelka D1 v zadnji časovni točki pospešene stabilnostne študije (12 tednov).

3.4 Statistična obdelava podatkov

Rezultate smo grafično prikazali s programom MS Excel 2013.

3.4.1 Vrednotenje instrumentalne HPLC metode

Umeritveni premici s pripadajočim R² za oQ10 in rQ10, ki smo ju uporabili pri preverjanju linearnosti metode v poglavju 3.2.3 in izračunu vsebnosti Q10 v poglavju 3.3, smo določili z linearno regresijo v programu MS Excel 2013.

Natančnost smo preverjali z RSD-ji rezultatov meritev vseh paralel posameznega QC vzorca. RSD smo izračunali s programom MS Excel 2013 z Enačbo 8.

Enačba 8

$$\text{RSD} [\%] = \frac{\text{SD}}{\text{AVE}} \times 100 \%$$

SD ... standardni odklon vsebnosti Q10 v QC vzorcu

AVE ... povprečje vsebnosti Q10 v QC vzorcu

3.4.2 Vsebnost Q10 v izdelkih in preverjanje analiznih metod

Iz vsebnosti Q10 (Enačbe 2, 3 in 4) smo izračunali AVE in RSD. Parametra smo izračunali iz različnih skupin podatkov, ker smo ju uporabili za različne namene (izračun vsebnosti Q10 v izdelku, dodatno preverjanje ponovljivosti priprave vzorca in homogenosti vsebnosti skupnega Q10 v različnih enotah izdelka).

Vsebnost skupnega Q10 v enoti izdelka

Iz rezultatov meritev vsebnosti skupnega Q10 (Enačba 4) vseh paralel vzorca, ki smo jih z eno metodo (P, O in R) pripravili iz ene enote izdelka (po postopku, opisanem v poglavju 3.2.2), smo izračunali AVE_M (Enačba 9) in RSD_M (Enačba 10). To smo naredili za vse vzorce, pripravljene iz posameznih raztopin vseh 10 testiranih izdelkov.

Tako izračunana povprečja smo uporabili za preverjanje, ali z uporabljenimi metodami dobimo primerljive vsebnosti skupnega Q10 v pripravljenih vzorcih (Primerjava analiznih metod v poglavju 3.3.2, rezultati so v Preglednici XII in na Sliki 8).

Vrednosti RSD smo uporabili za preverjanje ponovljivosti priprave vzorca z metodami P, O in R za merjenje vsebnosti skupnega Q10 (Preglednica XII). Za mejo sprejemljivosti smo postavili $RSD \leq 5 \%$.

Enačba 9

$$AVE_M = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

AVE_M ... povprečje vsebnosti skupnega Q10 vzorcev, pripravljenih iz iste raztopine
 x ... vsebnost skupnega Q10 v posameznem vzorcu (Enačba 4)
 n ... število paralel vzorca; metodi P in O: $n = 3$, metoda R: $n = 2$

Enačba 10

$$RSD_M [\%] = \frac{SD_M}{AVE_M} \times 100 \%$$

SD_M ... standardni odklon vsebnosti skupnega Q10 vzorcev, pripravljenih iz iste raztopine
 AVE_M ... povprečje vsebnosti skupnega Q10 vzorcev, pripravljenih iz iste raztopine (Enačba 9)

Vsebnost skupnega Q10 v izdelku

Vsebnosti skupnega Q10 (Enačba 4), ki smo jih izmerili vsem paralelam vzorcev, pripravljenih z eno metodo (P, O in R) po postopku, opisanem v poglavju 3.2.2, iz različnih enot istega izdelka, smo uporabili za izračun AVE_S (Enačba 11) in RSD_S (Enačba 12). To

smo naredili za vseh 10 testiranih izdelkov.

Tako izračunana povprečja smo uporabili za izračun ujemanja vsebnosti skupnega Q10 z navedenimi vsebnostmi Q10 (Enačba 6).

RSD-je, izračunane iz vzorcev, pripravljenih iz različnih enot izdelka (RSD_S; Enačba 12), smo primerjali z RSD-ji vzorcev, pripravljenih iz iste enote izdelka (RSD_M; Enačba 10). S tem smo preverili, ali je ponovljivost priprave vzorca dovolj velika glede na variabilnost vsebnosti skupnega Q10 v različnih enotah posameznega izdelka.

Enačba 11

$$AVE_S = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

AVE_S ... povprečje vsebnosti skupnega Q10 vzorcev, pripravljenih iz raztopin istega izdelka

x ... vsebnost skupnega Q10 v posameznem vzorcu (Enačba 4)

n ... število paralel vzorca; 1. časovna točka: metodi P in O: n = 9, metoda R: n = 6

naslednje časovne točke: n = 6

Enačba 12

$$RSD_S [\%] = \frac{SD_S}{AVE_S} \times 100 \%$$

SD_S ... standardni odklon vsebnosti skupnega Q10 vzorcev, pripravljenih iz raztopin istega izdelka

AVE_S ... povprečje vsebnosti skupnega Q10 vzorcev, pripravljenih iz raztopin istega izdelka (Enačba 11)

Vsebnost oQ10 in rQ10 v izdelku

Vsebnosti oQ10 in rQ10 (Enačbi 2 in 3), ki smo jih izmerili vsem paralelam vzorcev, pripravljenih z metodo P (po postopku, opisanem v poglavju 3.2.2) iz različnih enot istega izdelka, smo uporabili za izračun AVE (Enačba 13). To smo naredili za vseh 10 testiranih izdelkov. Tako izračunana povprečja smo uporabili za izračun ujemanja vsebnosti oQ10 in rQ10 z navedenimi vsebnostmi posamezne oblike Q10 (Enačba 5).

Enačba 13

$$AVE = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

AVE ... povprečje vsebnosti oQ10 oz. rQ10 vzorcev, pripravljenih iz raztopin istega izdelka

x ... vsebnost oQ10 oz. rQ10 v posameznem vzorcu (Enačba 2 oz. 3)

n ... število paralel vzorcev; 1. časovna točka: n = 9, naslednje časovne točke: n = 6

Statistični test za primerjavo analiznih metod

Izračunana povprečja vsebnosti skupnega Q10 v vzorcih, pripravljenih z vsemi izbranimi metodami (po postopku, opisanem v poglavju 3.2.2), smo primerjali, da bi ugotovili, ali z uporabljenimi metodami dobimo primerljive rezultate. Zato smo s programom MS Excel 2013 izvedli statistični test enofaktorska analiza variance (ANOVA: Single Factor).

Pri vsakem izmed 6 izbranih izdelkov (A, B, C, D1, I, J) smo med seboj primerjali 3 skupine meritev. Vsaka skupina je predstavljala rezultate vsebnosti skupnega Q10, izmerjene s posamezno metodo (P, O in R). Ker smo analizirali 3 kapsule posameznega pripravka, smo v vsaki skupini imeli 3 vrednosti AVE_M (povprečja paralel vzorcev, pripravljenih iz ene enote izdelka; Enačba 9).

Enak statistični test smo naredili še s podatki vseh izdelkov hkrati. Tako smo v posamezni skupini (P, O in R) dobili 18 vrednosti (po 3 vrednosti od vsakega izmed 6 izdelkov). Vsebnosti skupnega Q10, izražene v mg, so se med izdelki zelo razlikovale. Zato smo za ta test vrednosti AVE_M , ki smo jih uporabili pri statističnem testu, opisanem v prejšnjem odstavku, normirali na tisto vsebnost, ki je bila znotraj posamezne enote izdelka najvišja. Npr. če smo med vzorci, ki so bili pripravljeni iz raztopine ene enote izdelka, izmerili najvišjo AVE_M v vzorcu, pripravljenem z metodo P, je to AVE_M predstavljalo 100 %. Rezultate vzorcev iz iste raztopine, pripravljene z ostalima dvema metodama, pa smo normirali na teh 100 %.

Izračunano p-vrednost smo primerjali z vrednostjo α , ki je bila 0,05. Če je bila p-vrednost nižja od 0,05, smo s testom dokazali statistično značilno razliko med metodami. Če je bila p-vrednost višja od 0,05, pa razlike med metodami niso bile statistično značilne in lahko zaključimo, da z njimi dobimo primerljive rezultate.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Namen eksperimentalnega dela je bil kvantitativno ovrednotiti vsebnost Q10 in njegovo stabilnost v izbranih izdelkih s tremi različnimi metodami, ki so bile že predhodno razvite v laboratoriju, ter pokazati, da z izbranimi metodami dobimo primerljive vsebnosti skupnega Q10. Vsebnost posamezne oblike Q10 lahko izmerimo samo z metodo P, z vsemi uporabljenimi metodami pa lahko izmerimo vsebnost skupnega Q10. Pri metodi O oksidiramo rQ10, če je prisoten v vzorcu, in tako skupen Q10 izmerimo v obliki oQ10. Pri metodi R pa morebiten oQ10 v vzorcu reduciramo in tako skupen Q10 izmerimo v obliki rQ10.

Najprej smo preskusili, ali so vse 3 metode primerne za vzorce, pripravljene iz izbranih izdelkov, in jih glede na dobljene rezultate še izboljšali. V nadaljevanju eksperimentalnega dela smo optimizirane metode uporabili za testiranje večjega števila izdelkov. Izmerili smo jim vsebnosti oQ10, rQ10 in skupnega Q10. Preverili smo, ali z uporabo teh metod dobimo primerljive rezultate vsebnosti skupnega Q10. Na koncu smo izvedli še pospešeno študijo stabilnosti pri povišani temperaturi in relativni vlažnosti, s katero smo preverili ugotovitve o stabilnosti Q10 v izbranih izdelkih in vplivu AK na stabilnost oQ10, ki smo jih opazili na podlagi izvedenih meritev vsebnosti Q10.

4.1 Optimizacija analiznih metod

Da bi preverili, ali so izbrane metode primerne za ugotavljanje vsebnosti Q10 v izbranih izdelkih, smo izmerili vsebnost skupnega Q10 v enem izdelku (D3). Uporabili smo metode, ki so bile že predhodno razvite v laboratoriju in so opisane v poglavju 3.2.2. Z metodo P smo dobili pričakovane rezultate (ugotovljena vsebnost skupnega Q10 je bila enaka navedeni), z drugima dvema metodama pa nismo dosegli uspešne oksidacije oz. redukcije Q10 v vzorcih. Zato smo spremenili nekatere parametre, da bi postopek izvedbe slednjih dveh metod izboljšali.

Spremljani parametri in rezultati optimizacije metode O so predstavljeni v Preglednici VIII. Preskusili smo drugo topilo ter različne koncentracije in vira oksidanta (Fe-ioni). Iz izkušenj v laboratoriju smo se najprej odločili za nižjo koncentracijo oksidanta in kot topilo uporabili ACN (0,01 % FeCl_3 v ACN). Nato smo preskusili še nižje in višje koncentracije oksidanta in raztopino $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ v ACN, vendar nismo dosegli kvantitativne oksidacije Q10. Boljše rezultate smo dobili, ko smo kot topilo, v katerem je raztopljen oksidant, uporabili brezvoden EtOH, saj smo praktično celoten Q10 uspeli oksidirati z 0,01 % raztopino Fe^{3+} (iz FeCl_3) v EtOH. V nadaljnjem eksperimentalnem delu smo uporabljali izboljšano metodo O.

Preglednica VIII: Rezultati optimizacije metode O

Topilo	Koncentracija Fe-ionov [%]	Koncentracija FeCl_3 oz. $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ [%]	Vir Fe-ionov	Delež oQ10 [%] (n = 4)
ACN	0,0001	0,0003	FeCl_3	3,9
ACN	0,001	0,003	FeCl_3	5,7
ACN*	0,003*	0,01*	FeCl_3^*	12,9*

ACN	0,03	0,1	FeCl ₃	1,2
ACN	0,1	0,3	FeCl ₃	0,0
ACN	0,01	0,05	FeSO ₄ ×7H ₂ O	5,0
EtOH	0,01	0,03	FeCl₃	99,8

* izhodni parametri

Z metodo R, ki je bila predhodno razvita v laboratoriju in je opisana v poglavju 3.2.2, nismo uspeli reducirati vsega Q10 (le 93,6 % skupnega Q10). Zato smo preskusili vpliv različnih parametrov na uspešnost redukcije. Spreminjali smo razmerje med reagenti in topilo za raztapljanje suhega ostanka. Spremljani parametri in rezultati optimizacije metode R so zbrani v Preglednici IX. Največji delež rQ10 smo dosegli z zamenjavo topila za raztapljanje posušenih ostankov in sicer smo namesto raztopine AK v ACN uporabili samo ACN. V nadaljnjem eksperimentalnem delu smo uporabljali izboljšano metodo R.

Preglednica IX: Rezultati optimizacije metode R

Koncentracija Q10 [mg/l]	Masa NaBH ₄ [mg]	Volumen MeOH = volumen 0,01 M raztopine EDTA [ml]	Topilo za raztapljanje suhega ostanka	Delež rQ10 [%] (n = 2)
250*	2,5*	1*	AK v ACN*	93,6*
250	10	4	AK v ACN	92,8
1000	10	4	AK v ACN	95,3
500	5	1	AK v ACN	94,5
250	2,5	1	ACN	98,3

* izhodni parametri

4.2 Vrednotenje instrumentalne HPLC metode

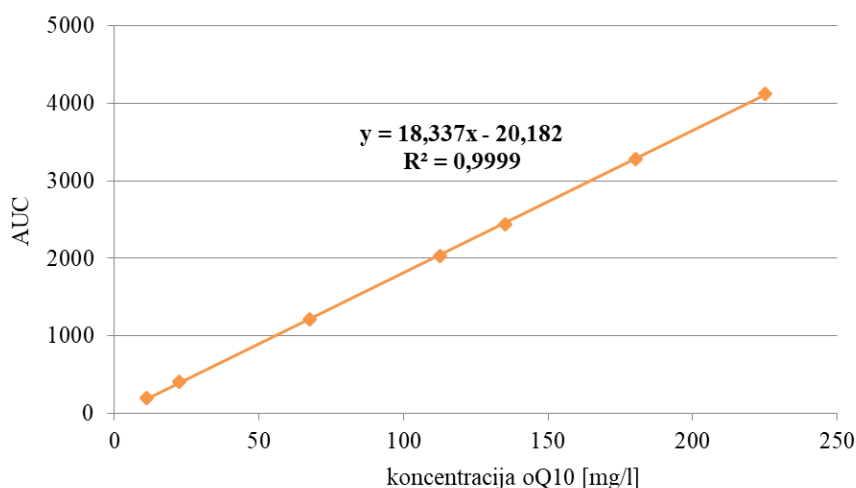
Celotna validacija instrumentalne HPLC metode je bila že izvedena v skladu s smernicami ICH (Mednarodna konferenca o usklajevanju tehničnih zahtev za registracijo zdravil za uporabo v humani medicini) (66). Zato smo preverili le nekatere parametre (selektivnost, linearnost, točnost in natančnost). Želeli smo potrditi, da je instrumentalna metoda ustrezna za kvantitativno vrednotenje vsebnosti oQ10, rQ10 in skupnega Q10 v vzorcih, pripravljenih po različnih postopkih. Delali smo po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.3.

Selektivnost

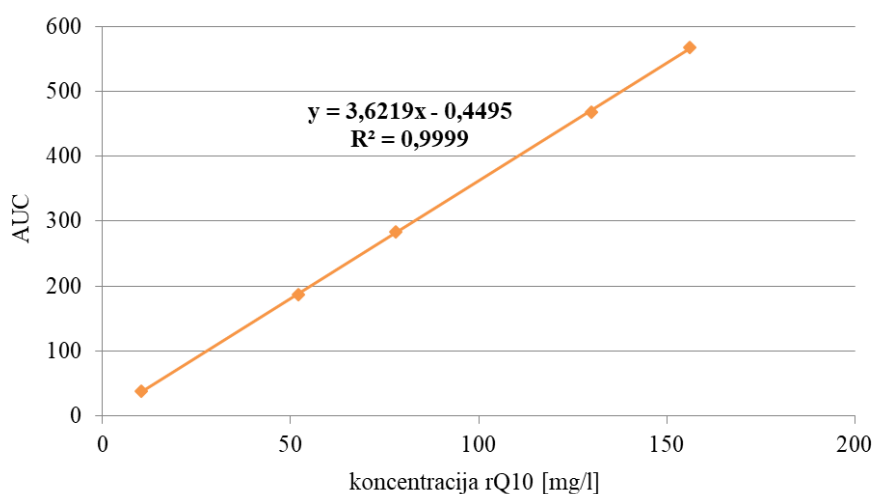
S prekrivanjem kromatogramov topil za raztapljanje posušenih ostankov (ACN, EtOH) ter standardov oQ10 in rQ10 smo pokazali, da je selektivnost metode ustrezna, saj pri retencijskih časih rQ10 in oQ10 ni bilo interferenc. Prav tako v pripravljenih vzorcih izdelkov ni bilo motečih spojin. Kromatogrami topil, standardov Q10 in izdelka D1 so v poglavju Priloge.

Linearnost

Za obe obliki Q10 smo potrdili linearnost, saj je bil R^2 pri obeh večji od 0,999. Rezultati so bili linearni v celotnem koncentracijskem območju, znotraj katerega smo analizirali vzorce (za oQ10: 10 – 225 mg/l, za rQ10: 10 – 200 mg/l). Premici sta skupaj z njunimi enačbami in vrednostmi R^2 predstavljeni na Slikah 2 in 3.



Slika 2: Umeritvena premica za oQ10



Slika 3: Umeritvena premica za rQ10

Točnost in natančnost

Pri obeh oblikah Q10 sta bili točnost in natančnost ustrezni (vrednosti kontrolnih vzorcev QC so bile pri točnosti znotraj ± 5 % nominalne koncentracije, pri natančnosti je bil RSD nižji od 5 %). Rezultati so zbrani v Preglednici X.

Preglednica X: Točnost in natančnost (RSD) instrumentalne metode

		Točnost [%]	Točnost [%]	Točnost [%]	RSD [%]
		QC ₁	QC ₂	QC ₃	
oQ10	QC _L	95,3	101,3	99,3	3,1
	QC _M	99,8	98,3	99,8	0,9
	QC _H	100,2	101,7	101,4	0,8
rQ10	QC _L	97,2	100,0	98,8	1,4
	QC _M	99,5	95,2	99,9	2,7

QC ... kontrolni vzorec nizke (L), srednje (M) in visoke (H) koncentracije

4.3 Vsebnost Q10 v izdelkih

Izbrali smo 10 izdelkov, ki jih lahko kupimo v Sloveniji, in imajo navedeno, da vsebujejo oQ10 (navedeno kot "ubidekarenon", "ubikinon" ali "koencim Q10") oz. rQ10 (navedeno kot "ubikinol"). Izdelek D je zdravilo, ostali so prehranska dopolnila. Vsi so predstavljeni v Preglednici III. Izbrane izdelke smo razdelili na 2 skupini:

- izdelka z navedenim rQ10 (I, J)
- izdelki z navedenim oQ10: (i) izdelki z navedeno AK (D1, E, F, G, H)
(ii) izdelki brez AK (A, B, C).

Vsem izdelkom smo izmerili vsebnost skupnega Q10 in vsebnost posameznih oblik Q10 po postopku, opisanem v poglavju 3.3.1. Položaj oQ10 na kromatogramu vzorca smo potrdili s primerjanjem kromatogramov vzorca in standarda Q10 (vsebuje samo oQ10), ki smo ju analizirali pod enakimi pogoji. Preverili smo ujemanje izmerjene vsebnosti oQ10, rQ10 in skupnega Q10 z navedenimi vsebnostmi na zunanji ovojnini izdelkov (Enačbi 5 in 6). Zanimalo nas je, ali je rQ10 dovolj stabilna v izdelkih, ki imajo navedeno, da vsebujejo samo rQ10, saj velja za manj stabilno obliko Q10 (22). S primerjavo rezultatov vsebnosti oQ10 v izdelkih z navedenim oQ10 z AK in brez nje smo želeli pokazati, da AK v izdelku poveča nestabilnost oQ10. To so namreč opazili že v drugih raziskavah (54, 58, 79).

V Preglednici XI vidimo rezultate ujemanja izmerjene vsebnosti Q10 z navedeno. Če upoštevamo mejo 90,0 – 115,0 %, je bila vsebnost navedene oblike Q10 ustrezna pri 4 od 10 izdelkov. Vsebnost skupnega Q10 je bila ustrezna pri 6 izdelkih od 10. Neustreznost vsebnosti skupnega Q10 smo opazili samo pri prehranskih dopolnilih, kjer je bila v enem izdelku vsebnost bistveno višja (166,0 %), v drugih pa nekoliko nižja (82,5 - 88,1 %) od navedene. Rezultati se ujemajo s podatki iz literature, kjer so med prehranskimi dopolnili s Q10 opazili velik razpon vsebnosti skupnega Q10 (0 – 165 %) (27, 57). Rezultati ujemanja vsebnosti z navedeno so boljši, če gledamo skupen Q10 in ne samo navedene oblike.

Preglednica XI: Vsebnost Q10 v izdelkih, izmerjena z metodo P (n = 9)

Oznaka izdelka	Navedena vsebnost in oblika Q10 [mg/kapsulo]	Vsebnost navedene oblike Q10 [mg/kapsulo] AVE ± SE	Delež navedene oblike Q10 [%]	Vsebnost skupnega Q10 [mg/kapsulo] AVE _S ± SE	Delež skupnega Q10 [%]
A	50; oQ10	46,1 ± 0,2	92,2	46,8 ± 0,2	93,7
B	30; oQ10	25,2 ± 0,1	84,2	49,8 ± 0,2	166,0
C	50; oQ10	47,0 ± 0,7	94,0	51,7 ± 0,6	103,4
D1	30; oQ10	8,7 ± 0,1	29,1	31,3 ± 0,2	104,3
E	30; oQ10	10,2 ± 0,1	34,0	30,0 ± 0,4	100,1
F	30; oQ10	24,7 ± 0,4	82,3	24,7 ± 0,4	82,5
G	10; oQ10	8,6 ± 1,2	86,1*	8,7 ± 0,1	86,6*
H	30; oQ10	21,8 ± 0,4	73,4	26,4 ± 0,4	88,1
I	30; rQ10	30,5 ± 0,1	101,7	32,0 ± 0,1	106,8
J	50; rQ10	52,5 ± 0,5	105,1	54,6 ± 0,5	110,6

AVE ... povprečje vsebnosti oQ10 oz. rQ10 v vzorcih, pripravljenih iz raztopin istega izdelka

AVE_S ... povprečje vsebnosti skupnega Q10 v vzorcih, pripravljenih iz raztopin istega izdelka

SE ... standardna napaka meritev

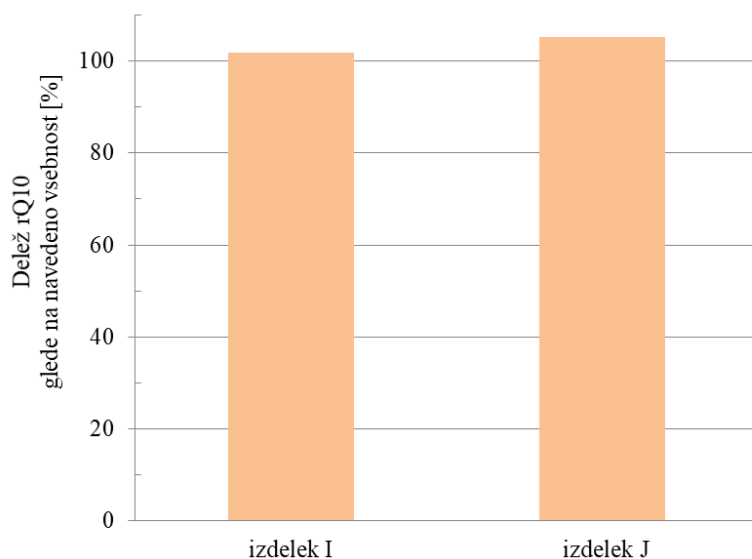
* izdelek smo testirali 1 mesec po izteku njegovega roka uporabnosti

krepko so označene vrednosti, ki so izven mej po USP (90,0 - 115,0 %)

V nadaljevanju je predstavljena bolj podrobna analiza rezultatov vsebnosti Q10 v izbranih izdelkih, razdeljenih glede na navedeno obliko Q10 in prisotnost AK.

4.3.1 Izdelka z navedenim rQ10

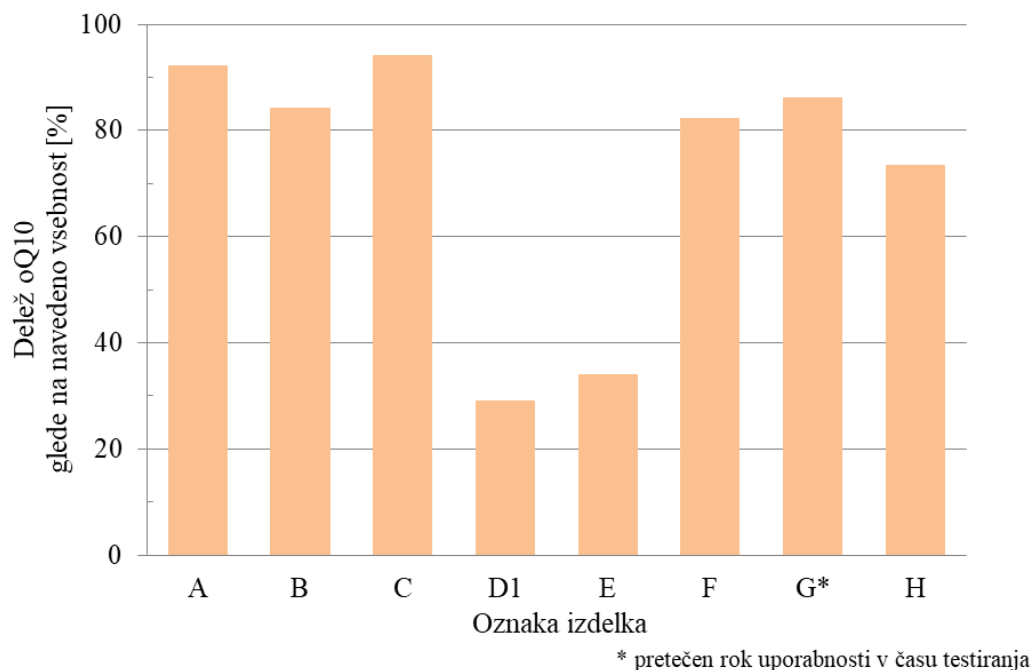
Testirali smo 2 izdelka, ki imata navedeno, da vsebujeta le rQ10 (I in J). Oba sta vsebovala približno 100 % navedene oblike, kar lahko vidimo na Sliki 4. Rezultati so bili malo nepričakovani, saj je znano, da se rQ10 hitro oksidira v oQ10 (22). Očitno je rQ10 v obeh izdelkih ustrezno stabilizirana, tudi v izdelku J, ki ne vsebuje AK. Da bi potrdili stabilnost rQ10 v izdelkih, smo v nadaljevanju izvedli pospešeno stabilnostno študijo, v kateri bi prej opazili nestabilnost kot pri sobnih pogojih.



Slika 4: Delež rQ10 glede na navedeno vsebnost v izdelkih z navedeno rQ10

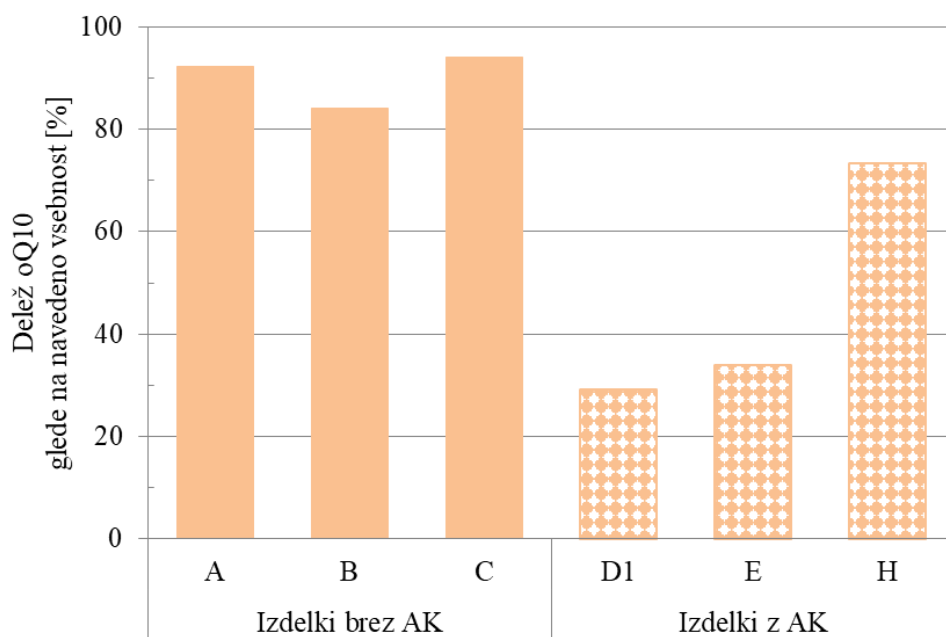
4.3.2 Izdelki z navedenim oQ10

Na Sliki 5 so prikazani izdelki, ki imajo navedeno, da vsebujejo samo oQ10. Med 8 izdelki sta le 2 vsebovala več kot 90,0 % navedene oblike (A in C), 2 pa sta imela samo približno tretjino navedene vsebnosti (D1 in E).



Slika 5: Delež oQ10 glede na navedeno vsebnost v izdelkih z navedeno oQ10

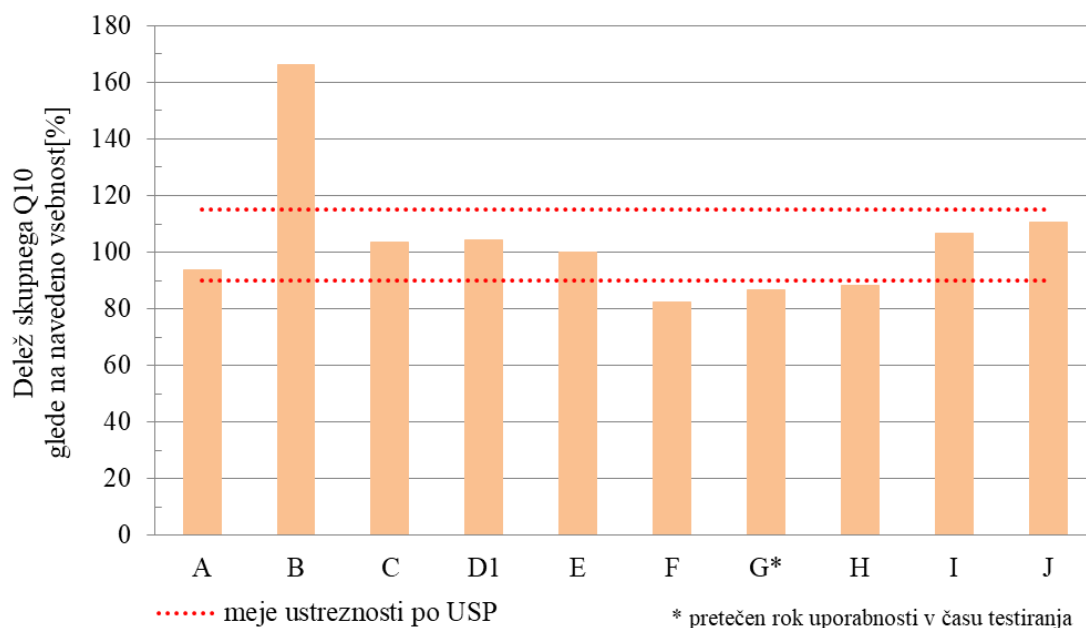
Pri izdelkih v obliki mehkih kapsul (vsebina kapsule je oljnata raztopina) smo opazili razliko med tistimi, ki vsebujejo AK (D1, E, H), in tistimi, ki ne vsebujejo AK (A, B, C), in sicer imajo izdelki brez AK večjo vsebnost oQ10 (Slika 6). AK je reducent, zato bi lahko zmanjšala stabilnost oQ10. Ostala 2 izdelka z navedeno oQ10 in AK (F, G), ki vsebujeta relativno veliko oQ10, sta v obliki trdih kapsul (vsebina kapsul je v obliki prahu). AK v trdnem agregatnem stanju pri sobni temperaturi verjetno nima velikega vpliva na stabilnost Q10, saj je za potek reakcije ugodneje, če so reaktanti že raztopljeni. To bi lahko pojasnilo relativno dobro stabilnost oQ10 v izdelkih z AK v obliki trdih kapsul. Ugotovitev je skladna s podatki iz literature, kjer so hitrejši potek redukcije Q10 opazili v tekočih izdelkih, medtem ko pri izdelkih v obliki trdih kapsul praktično ni bilo sprememb (57). Da bi potrdili hipotezi o manjši stabilnosti oQ10 v prisotnosti AK in večji stabilnosti oQ10 v trdih kapsulah, smo v nadaljevanju eksperimentalnega dela izvedli pospešeno študijo stabilnosti pri višji temperaturi in relativni vlažnosti.



Slika 6: Delež oQ10 glede na navedeno vsebnost v izdelkih v obliki mehkih kapsul z navedeno oQ10

4.3.3 Vsebnost skupnega Q10

Čeprav proizvajalci na izdelkih navajajo, da ti vsebujejo določeno obliko Q10, se za vrednotenje vsebnosti Q10 v prehranskih dopolnilih po predpisih USP zahteva samo merjenje vsebnosti skupnega Q10 (2). Na Sliki 7 so predstavljene izmerjene vsebnosti skupnega Q10 v testiranih izdelkih. Kriterijem USP (90,0 – 115,0 %) je ustrezalo 6 izdelkov od 10 (2). Izdelku G smo vsebnost izmerili 1 mesec po izteku roka uporabnosti, zato je neustreznost deloma pričakovana. Kot smo videli že pri rezultatih v Preglednici XI, je ujemanje z navedeno vsebnostjo večje pri skupnem Q10 kot pri posamezni navedeni obliki Q10. Če po enakih kriterijih vrednotimo vsebnosti skupnega Q10, izdelka D1 in E ustrezata postavljenim zahtevam vsebnosti Q10 (pri upoštevanju navedene oblike Q10 je izdelek D1 vseboval 29,1 %, izdelek E pa 34,0 % navedene vsebnosti).



Slika 7: Delež skupnega Q10 glede na navedeno vsebnost v izdelkih

Sklepamo, da se obliki pretvarjata ena v drugo in zato se njuna skupna vsebnost ne spremeni bistveno. Predpostavljamo, da AK kot reducent pospeši pretvarjanje oQ10 v rQ10. Da bi potrdili to hipotezo, smo v nadaljevanju izvedli pospešeno stabilnostno študijo, kjer smo primerjali spreminjanje vsebnosti oQ10 v izdelkih z in brez AK.

Pri razdelitvi izdelkov na 2 skupini na podlagi navedene vsebnosti oQ10 in rQ10 smo tiste, ki so imeli navedeno, da vsebujejo "koencim Q10" (B, E, F in G), uvrstili v skupino z navedeno oQ10, saj se ta izraz večinoma uporablja kot sopomenka za oQ10 (2, 8, 25). Če pa pod poimenovanjem "koencim Q10" upoštevamo skupen Q10, torej zmes oQ10 in rQ10, izdelek E ustreza postavljenim kriterijem vsebnosti skupnega Q10. V primeru Q10, ko še ni sprejete enotne definicije, katero obliko mislimo s poimenovanjem "koencim Q10", lahko proizvajalci prikrijejo nestabilnost posamezne oblike Q10, saj se vsebnost skupnega Q10 med njunim pretvarjanjem ne spremeni bistveno. Ampak ni vseeno, katera oblika Q10 je prisotna v izdelku. Z vidika kakovosti izdelka oz. njegove predstavitve je prisotnost nenavedene oblike Q10 neustrezna in zavajajoča. Zaradi večje biološke uporabnosti je rQ10 bolj zaželena od pogostejše uporabljene oQ10 (15, 16). Vendar je izdelava izdelkov z rQ10 zaradi slabše stabilnosti rQ10 med rokovanjem v primerjavi z oQ10 zahtevnejša in posledično tudi dražja (22). Vidimo, da je zelo pomembno pravilno in nedvoumno označevanje snovi, ki jih izdelek vsebuje.

Pri izdelku B smo ugotovili zelo velik odklon od navedene vsebnosti (166,0 %). Pri prehranskih dopolnilih proizvajalci pogosto dodajo presežek snovi, da njihova vsebnost ne bi padla pod navedeno do konca roka uporabnosti. Takšen način zagotavljanja kakovosti izdelka je izjema, ki jo najdemo tudi v smernicah EMA o zagotavljanju kakovosti končnih izdelkov. Tam je navedeno, da se ob sprostitvi izdelka na trg lahko uporabi presežek tistih snovi, ki so zelo nestabilne (npr. vitamini), in za katere poznamo mehanizme pretvorb, pod pogojem, da tako velika količina ne predstavlja nevarnosti za uporabnika (80). Potrebno je torej paziti, da zaradi vsebnosti večje količine aktivne snovi od navedene uporabniki ne zaužijejo prevelikega odmerka. Zato izdelke, s katerimi dosežemo visoke odmerke učinkovin, uvrščamo med zdravila. Pri prehranskih dopolnilih imamo za vitamine in minerale predpisane zgornje meje priporočenega vnosa (PDV oz. RDA) teh snovi (81). Za Q10 ni definirane vrednosti PDV, zato se priporočila o največjem priporočenem dnevnem vnosu Q10 s prehranskimi dopolnili razlikujejo med državami (Avstralija: 150 mg, Belgija 200 mg, Japonska: 300 mg) (18). V Sloveniji je JAZMP postavila mejo med zdravili in prehranskimi dopolnili s Q10 in sicer se izdelki z več kot 50 mg Q10 praviloma opredelijo kot zdravila. Ta meja je relativno nizka. JAZMP v smernicah kot razlog za postavljeno vrednost navaja, da se dnevni odmerki Q10, višji od 50 mg, večinoma uporabljajo v terapiji (50). Če bi upoštevali meje oz. priporočila o vnosu vitaminov (kamor sicer Q10 ne spada, ima pa podoben mehanizem delovanja), ki določajo, da je priporočen zgornji dnevni odmerek 2-3-krat višji od PDV, bi za Q10 v Sloveniji ta znašal 100 - 150 mg (81). To vrednost lahko uporabimo za vrednotenje kakovosti oz. varnosti izdelka B, saj ima vsebnost Q10 veliko večjo od navedene. Njegov proizvajalec priporoča, da lahko zaužijemo do 3 kapsule na dan. Tako bi zaužili 90 mg Q10 dnevno. Ker pa je vsebnost dejansko 166,0 % navedene, bi lahko z jemanjem tega izdelka dnevno zaužili skoraj 150 mg Q10 (149,4 mg). Če bi upoštevali zgoraj opisane kriterije za priporočeno zgornjo mejo vsebnosti za vitamine, kamor Q10 sicer ne uvrščamo, je izdelek B ustrezen, vendar bi po smernicah JAZMP praviloma moral biti uvrščen med zdravila, ker z njegovo uporabo presežemo dnevni vnos 50 mg. Kljub zelo prekoračeni vsebnosti Q10 pa oQ10 v tem izdelku ni dovolj stabilen, da bi njegova vsebnost v času roka uporabnosti ostala nad 90 % navedene vsebnosti, kar vidimo na Sliki 5.

4.4 Primerjava analiznih metod

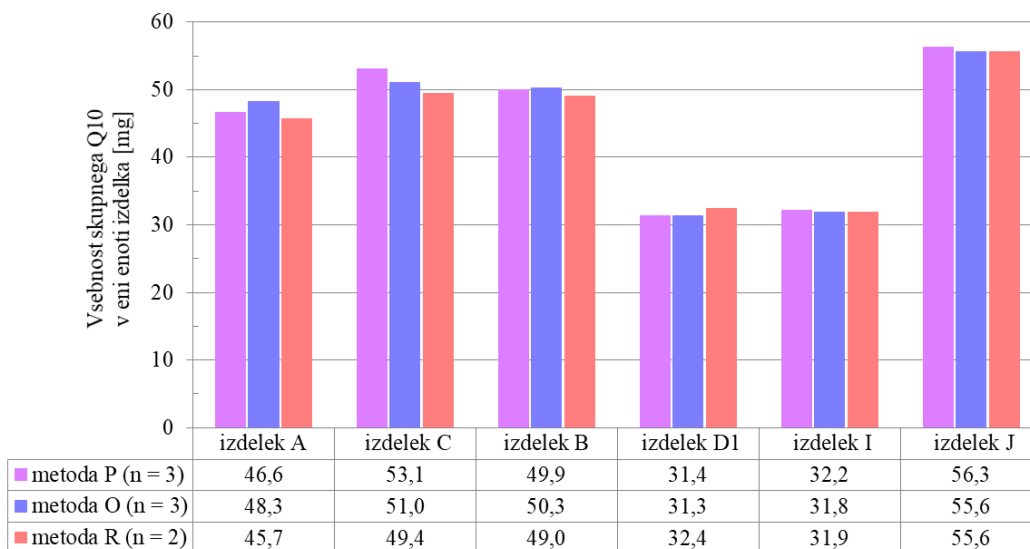
Za ugotavljanje vsebnosti Q10 v prehranskih dopolnilih, ki so v obliki mehkih in trdih

kapsul, je v USP predpisan postopek, v katerem pretvorimo prisoten Q10 v oQ10 in tako izmerimo vsebnost skupnega Q10 (2). Na podoben način lahko izmerimo vsebnost skupnega Q10 z redukcijo, kjer prisoten Q10 pretvorimo v rQ10.

Pri našem eksperimentalnem delu smo za merjenje vsebnosti skupnega Q10 v izbranih izdelkih uporabili metodo P in optimizirani metodi z oksidacijo (metoda O) oz. redukcijo (metoda R) vzorca, ki so opisane v poglavju 3.2.2. Želeli smo pokazati, da so rezultati vsebnosti skupnega Q10 v izbranih izdelkih, pridobljeni z omenjenimi metodami, primerljivi. Na podlagi vsebnosti posamezne oblike Q10, ki smo jo ugotovili pri merjenju vsebnosti Q10 (Poglavje 3.3.1, rezultati v poglavju 4.3), smo izbrali 6 izdelkov. Razdelili smo jih v 3 skupine:

- visoka vsebnost oQ10: izdelek A in C
- srednja vsebnost oQ10: izdelek B in D1
- nizka vsebnost oQ10 oz. visoka vsebnost rQ10: izdelek I in J

Na Sliki 8 so prikazana povprečja vsebnosti skupnega Q10, pridobljena iz vzorcev ene enote posameznega izdelka (AVE_M – Enačba 9), v Preglednici XII pa so zbrana povprečja vseh enot testiranih izdelkov.



Slika 8: Vsebnost skupnega Q10 v eni enoti izbranih izdelkov

Preglednica XII: Podatki za primerjavo metod P, O in R

Oznaka izdelka	Številka enote (kapsule)	Metoda P		Metoda O		Metoda R	
		AVE _M [mg]	RSD _M [%]	AVE _M [mg]	RSD _M [%]	AVE _M [mg]	RSD _M [%]
A	1	46,7	0,4	46,7	0,6	44,1	0,2
	2	47,2	1,6	48,0	0,2	45,8	0,5
	3	46,6	0,9	48,3	1,1	47,6	-
RSD _S [%]		1,1		1,8		3,2	
C	1	52,6	1,4	51,6	1,5	52,5	0,8
	2	49,3	1,0	47,6	1,4	51,6	1,4
	3	53,1	0,8	51,0	0,3	54,6	-
RSD _S [%]		3,6		3,9		2,4	
B	1	50,1	0,6	50,3	0,9	50,1	1,1
	2	49,4	2,0	50,4	0,7	50,2	1,2
	3	49,9	1,7	50,3	0,9	49,0	-
RSD _S [%]		1,5		0,7		1,3	
D1	1	30,9	2,1	31,0	0,7	31,8	0,5
	2	31,6	1,1	30,9	0,7	31,7	0,3
	3	31,4	0,6	31,3	0,5	32,4	0,3
RSD _S [%]		1,6		0,8		1,0	
I	1	31,8	1,4	31,1	1,1	32,5	1,4
	2	32,1	0,8	31,4	0,7	32,8	0,6
	3	32,2	0,2	31,8	1,5	31,9	1,5
RSD _S [%]		0,9		1,4		1,6	
J	1	56,2	0,4	54,8	0,5	-	-
	2	53,4	0,1	52,1	0,1	-	-
	3	56,3	0,5	55,6	0,7	55,6	1,4
RSD _S [%]		2,6		3,0		(1,4)	

AVE_M ... povprečje vsebnosti skupnega Q10 v vzorcih, pripravljenih iz raztopine ene enote izdelka s posamezno metodo (Enačba 9); metodi P in O: n = 3, metoda R: n = 2

RSD_M ... relativni standardni odklon vsebnosti skupnega Q10 v vzorcih, pripravljenih iz raztopine ene enote izdelka s posamezno metodo (Enačba 10); metodi P in O: n = 3, metoda R: n = 2

RSD_S ... relativni standardni odklon vsebnosti skupnega Q10 v vzorcih, pripravljenih iz različnih enot istega izdelka s posamezno metodo (Enačba 12); metodi P in O: n = 9, metoda R: n = 6

- ... zaradi tehničnih težav smo meritve vzorca izključili iz primerjave

Primerljivost metod smo preverili s statističnim testom, katerega izvedba je opisana v poglavju 3.4.2. Rezultati (p-vrednosti) so zbrani v Preglednici XIII. S primerjavo metod P, O in R za merjenje vsebnosti skupnega Q10 v posameznem izdelku smo s statističnim testom pri 5 testiranih izdelkih od skupno 6 pokazali, da ne moremo potrditi razlike med metodami, saj so bile p-vrednosti večje od 0,05. Pri izdelku D1, pri kateremu s statističnim testom nismo potrdili primerljivosti, je p-vrednost relativno blizu postavljeni mejni vrednosti ($\alpha = 0,05$). Da bi dobili večje število vrednosti v posamezni skupini in s tem zagotovili večjo reprezentativnost rezultata testa, smo naredili enak statistični test s podatki vseh izdelkov skupaj, s to razliko, da smo povprečja vsebnosti skupnega Q10, ki smo jih uporabili v statističnem testu s posameznimi izdelki, normirali znotraj posamezne enote, kar je podrobneje opisano v poglavju 3.4.2. Rezultat tega statističnega testa je naveden v Preglednici XIII. Vrednost je veliko večja od postavljene meje, torej lahko potrdimo, da z uporabljenimi metodami dobimo primerljive rezultate vsebnosti skupnega Q10.

Preglednica XIII: Rezultati statističnih testov

Oznaka izdelka	p-vrednost
A	0,222
C	0,271
B	0,286
D1	0,031
I	0,052
J	0,689
vseh 6 izdelkov (normirane vrednosti)	0,131

krepko je označena vrednost, ki ni potrdila primerljivosti metod

Dodatno preverjanje analiznih metod

Ponovljivost priprave vzorca

V Preglednici XII so zbrane vrednosti RSD_M za vse 3 metode (izračunane z Enačbo 10). Predstavljajo merilo ponovljivosti priprave vzorca, ker so izračunane iz rezultatov vsebnosti vzorcev, pripravljenih iz raztopine ene enote izdelka. Vse vrednosti so nižje od postavljene meje 5 %, torej je priprava vzorcev ponovljiva.

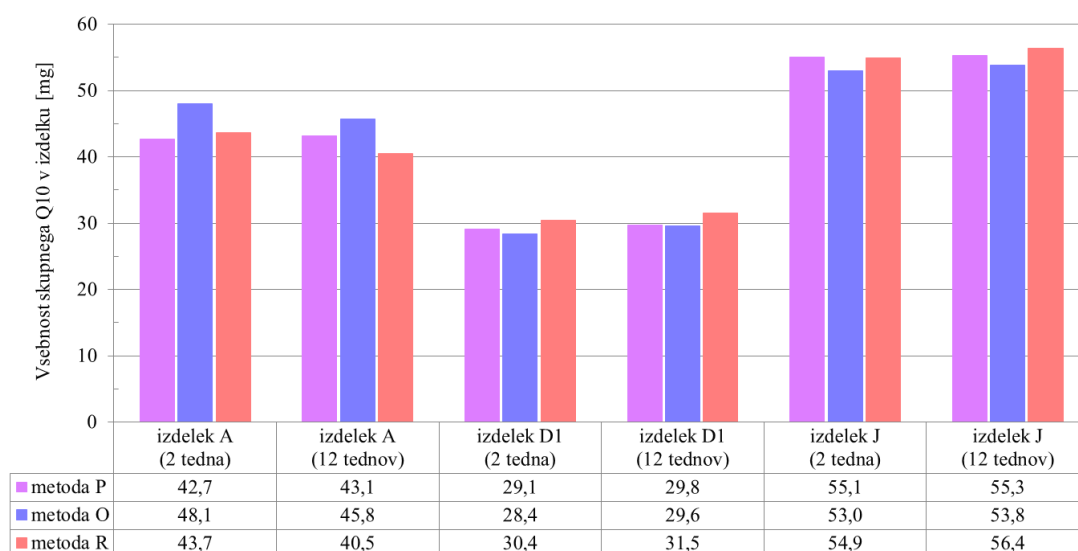
Homogenost vsebnosti skupnega Q10 v različnih enotah izdelka

V Preglednici XII so pri vsakem izdelku zapisane vrednosti RSD_S (izračunane z Enačbo 12),

ki predstavljajo merilo homogenosti vsebnosti skupnega Q10 v testiranih izdelkih, saj so izračunane iz rezultatov vsebnosti vzorcev, pripravljenih z metodo P, O oz. R iz raztopin več enot posameznega izdelka. Primerjali smo jih z vrednostmi RSD_M istega izdelka in iste uporabljene metode. Večinoma so RSD_S višji od primerjanih RSD_M . Iz tega lahko sklepamo, da obstaja variabilnost vsebnosti Q10 v kapsulah istega izdelka oz. da je ta variabilnost večja od variabilnosti priprave vzorcev z izbranimi metodami. Torej se izmerjena vsebnost skupnega Q10 v različnih enotah istega izdelka lahko razlikuje zaradi variabilnosti v vsebnosti Q10 v različnih enotah izdelka. Ker so odstopanja v vsebnosti med kapsulami relativno majhna, ne moremo govoriti o nehomogenosti vsebnosti Q10 v izdelkih, še enkrat pa lahko potrdimo, da so izbrane metode primerne za določanje vsebnosti skupnega Q10.

Primerjava metod v pospešeni stabilnostni študiji

Iz vsake skupine smo izbrali en izdelek (A, D1 in J), kateremu smo vsebnost skupnega Q10 izmerili z vsemi tremi metodami tudi v ostalih časovnih točkah pospešene stabilnostne študije, da smo dodatno potrdili primernost metod. Rezultate dveh časovnih točk (2 tedna in 12 tednov) lahko vidimo na Sliki 9.



Slika 9: Vsebnost skupnega Q10 v izdelkih v časovnih točkah 2 in 12 tednov

4.5 Stabilnost Q10 v izdelkih

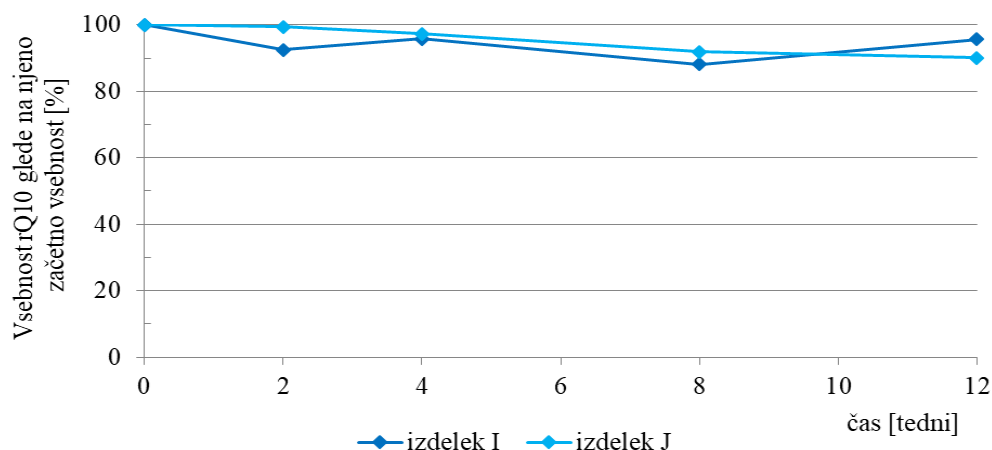
V pospešeni stabilnostni študiji smo izdelke za 12 tednov izpostavili temperaturi 40 °C in relativni vlažnosti 75 %. V vnaprej določenih časovnih točkah smo vrednotili stabilnost oQ10, rQ10 in skupnega Q10, kot je opisano v poglavju 3.3.3. S pospešeno stabilnostno

študijo lahko hitreje opazimo nestabilnost snovi in s tem dobimo rezultate v krajšem času. Ocenimo lahko, da so rezultati, ki smo jih pridobili pri takšnih pospešenih pogojih, približno ekvivalentni rezultatom 12-mesečnega testiranja pri sobnih pogojih (82).

Namen pospešene stabilnostne študije je bil preveriti in potrditi ugotovitve, ki smo jih izpeljali iz izmerjenih vsebnosti Q10 v 1. časovni točki (0 tednov). Zanimalo nas je, ali se bo vsebnost rQ10 v izdelkih, ki imajo navedeno, da vsebujejo le to obliko Q10 (I, J), znižala pri povišani temperaturi in relativni vlažnosti, saj se je rQ10 pri meritvi vsebnosti v izhodiščni časovni točki izkazala za stabilno v izdelku. Potrditi smo želeli, da je nestabilnost oQ10 v izdelkih v obliki mehkih kapsul z AK (D1, E, H) večja kot v izdelkih v obliki mehkih kapsul brez AK (A, B, C). Prav tako smo želeli preveriti, ali je oQ10 v prisotnosti AK bolj stabilna v izdelkih v obliki trdih kapsul kot v izdelkih v obliki mehkih kapsul tudi pri povišani temperaturi in vlažnosti. Vpliv AK na stabilnost oQ10 smo želeli še dodatno potrditi s primerjanjem vsebnosti Q10 v izdelkih D z različnim datumom izdelave, ki so bili shranjeni pri sobnih pogojih. V nadaljevanju so podrobneje predstavljeni rezultati pospešene študije stabilnosti. Razdelili smo jih po skupinah, v katere smo testirane izdelke razdelili glede na navedeno obliko Q10 in prisotnost AK. Posebej smo vrednotili vsebnost skupnega Q10.

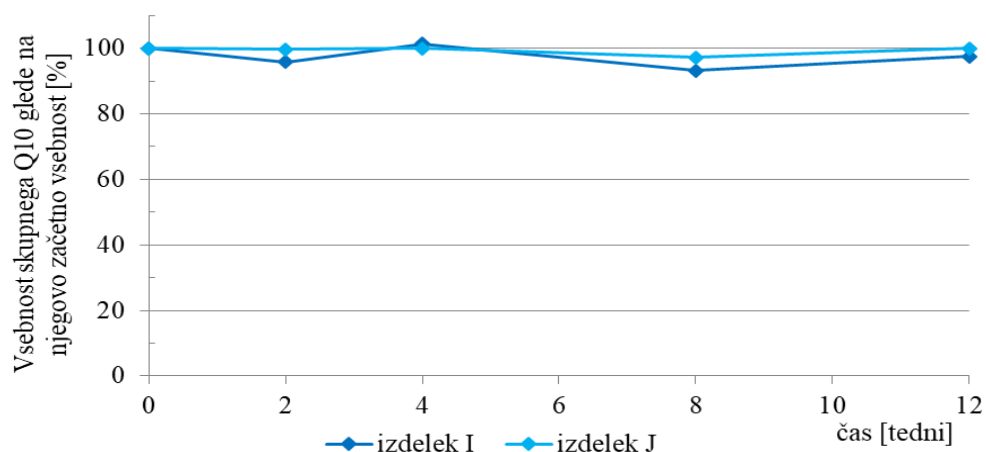
4.5.1 Izdelka z navedeno rQ10

Pri izdelkih z navedeno rQ10 smo ugotovili podoben trend zniževanja vsebnosti rQ10 s časom. Pri obeh se je vsebnost navedene oblike do konca pospešene stabilnostne študije znižala za približno 10 %, kar lahko vidimo na Sliki 10. Pričakovali smo, da se bo vsebnost rQ10 pri povišani temperaturi in relativni vlažnosti bolj znižala, saj rQ10 velja za nestabilno obliko Q10, ki se hitro pretvarja v oQ10 (22). Vendar rezultati kažejo, da je rQ10 v izbranih izdelkih dobro stabilizirana. AK, ki je prisotna v izdelku I, ni izraziteje stabilizirala Q10. Ob koncu pospešene stabilnostne študije sta oba pripravka vsebovala približno 90 % navedene rQ10, torej sta že na meji ustreznosti.



Slika 10: Vsebnost rQ10 glede na njeno začetno vsebnost v izdelkih z navedeno rQ10

Kot lahko vidimo na Sliki 11, se je vsebnost skupnega Q10 le minimalno znižala. Iz tega lahko sklepamo, da je pretvorba rQ10 v oQ10 delno potekla. Če bi testirali več izdelkov z navedeno rQ10 in s tem zagotovili večjo reprezentativnost rezultatov, bi mogoče v katerem tudi opazili nestabilnost rQ10.

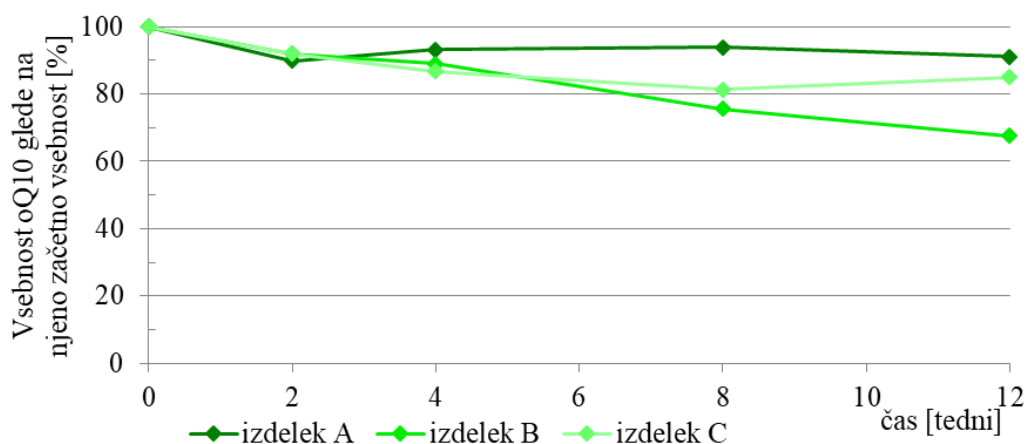


Slika 11: Vsebnost skupnega Q10 glede na njegovo začetno vsebnost v izdelkih z navedeno rQ10

4.5.2 Izdelki z navedeno oQ10 brez AK

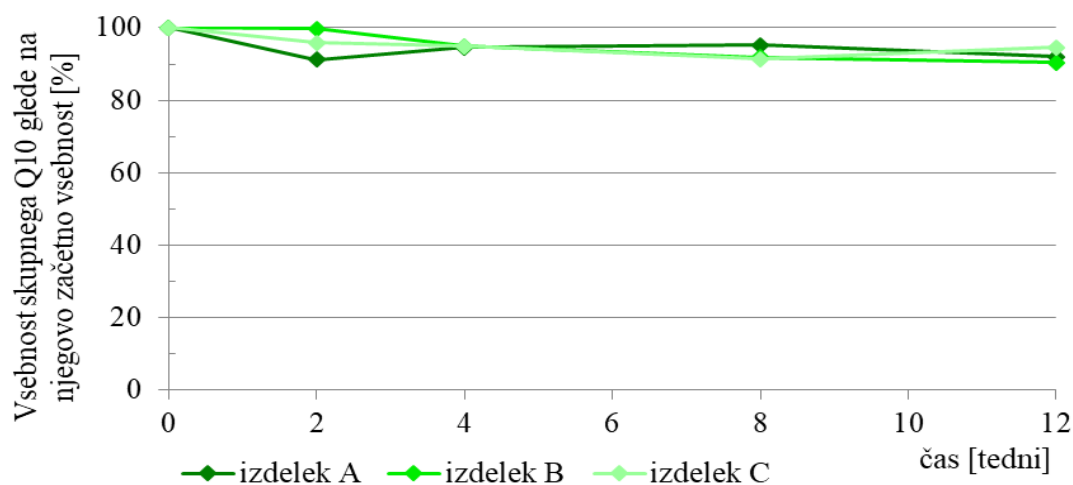
Na Sliki 12 vidimo izrazit trend padanja vsebnosti oQ10 pri izdelku B, medtem ko pri ostalih dveh izdelkih ocenjujemo, da se vsebnost oQ10 ne bi več zelo znižala, če bi študijo nadaljevali, saj se je v zadnjem mesecu vsebnost oQ10 le minimalno znižala. Med izdelki v tej skupini je izdelek B imel najmanjši delež oQ10 glede na navedeno vsebnost že pred začetkom izvedbe študije (Slika 5). Po pregledu navedenih ostalih snovi v izdelku B, ki bi lahko vplivale na tak rezultat, bi kot reducenta lahko delovala vitamina E in D. Vendar iz

podatkov predhodno izvedenih raziskav vemo, da vitamin E ne vpliva na stabilnost oQ10 (54). To lahko vidimo tudi iz rezultatov ostalih dveh izdelkov, saj oba vsebujeta vitamin E in se jima vsebnost oQ10 ni tako znižala. Tudi pripravek A vsebuje vitamin D, zato lahko sklepamo, da vitamin D nima velikega vpliva na stabilnost oQ10. Morda ribje olje kot podlaga zmanjša stabilnost oQ10 v izdelku B. Povezavo med stabilnostjo oQ10 in ribjim oljem kot podlago smo opazili tudi pri izdelku E, kar je opisano v naslednjem poglavju (poglavje 4.5.3). V različnih raziskavah so potrdili vpliv vrste medija, v katerem je raztopljen Q10 (največkrat gre za različna olja), na pretvarjanje oQ10 v rQ10. Preučevali so sicer samo rastlinska olja, ki so v primerjavi z etanolom boljša izbira v smislu stabilnosti oQ10 (54, 57).



Slika 12: Vsebnost oQ10 glede na njeno začetno vsebnost v izdelkih z navedeno oQ10 brez AK

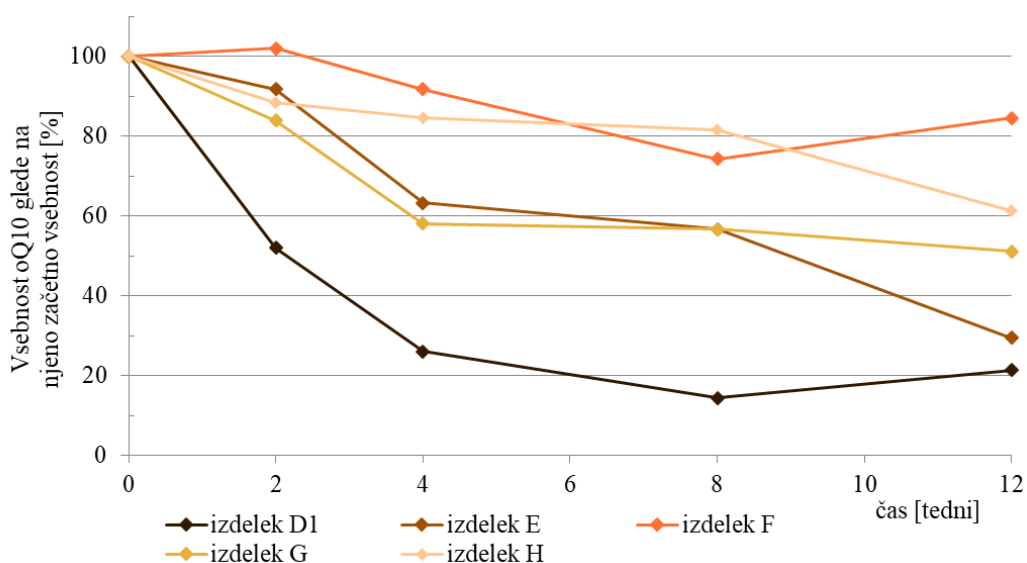
Znižanje vsebnosti skupnega Q10 (Slika 13) je bilo pri vseh treh izdelkih veliko manjše od znižanja vsebnosti oQ10, kar kaže na to, da gre pri nestabilnosti oQ10 predvsem za pretvarjanje oQ10 v rQ10 in ne za dejansko pretvorbo Q10.



Slika 13: Vsebnost skupnega Q10 glede na njegovo začetno vsebnost v izdelkih z navedeno oQ10 brez AK

4.5.3 Izdelki z navedeno oQ10 in AK

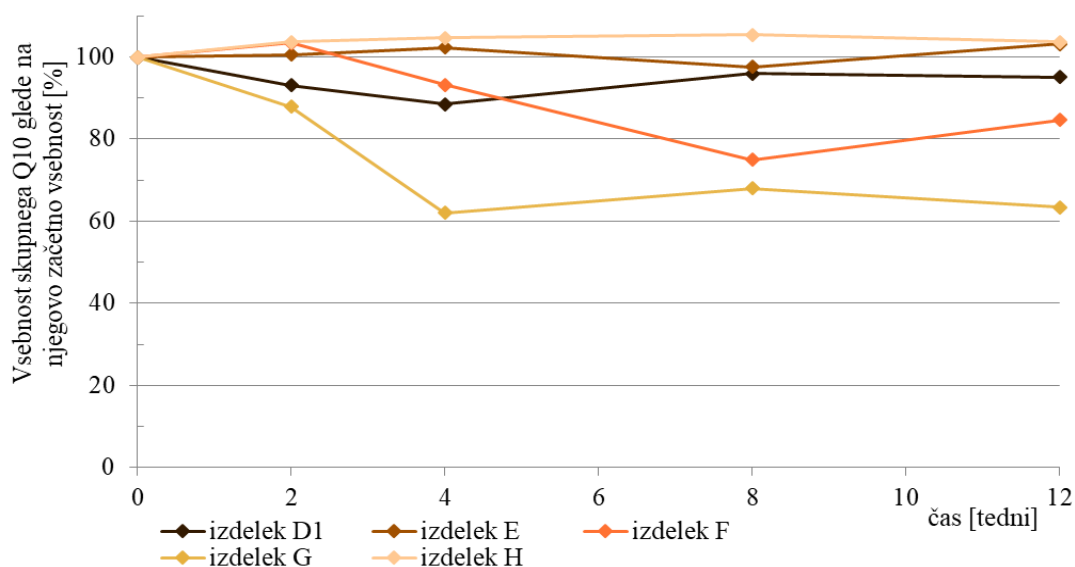
Pri izdelkih z AK je bilo znižanje vsebnosti oQ10 do konca študije izrazito večje kot pri izdelkih brez AK (Sliki 14 in 12). Največje znižanje smo opazili pri tistih dveh, ki sta že na začetku študije imela najmanjšo vsebnost oQ10 (D1 in E). Oba izdelka poleg AK vsebujeta še druge antioksidante, ki bi lahko imeli podoben vpliv kot AK. Ponovno lahko izključimo vitamin E, ker so v raziskavah že ovrgli njegov vpliv na stabilnost oQ10 (54). V izdelku D1 sta prisotna še betakaroten in selen, v izdelku E pa hidroksitirozol, cink ter morebitni drugi antioksidanti v izvlečkih plodu oljke, rožmarina in eteričnega olja česna. Izdelek E vsebuje kot podlago ribje olje, tako kot izdelek B iz skupine izdelkov z navedeno oQ10 brez AK, kateremu se je vsebnost oQ10 v njegovi skupini najbolj znižala (poglavje 4.5.2).



Slika 14: Vsebnost oQ10 glede na njeno začetno vsebnost v izdelkih z navedeno oQ10 in AK

V skupini izdelkov z navedeno oQ10 in AK sta pri merjenju vsebnosti oQ10 v prvi časovni točki izstopala izdelka F in G, ki sta v primerjavi z mehкими kapsulami vsebovala relativno veliko oQ10. Hipotezo o večji stabilnosti oQ10 v trdih kapsulah smo preverili z rezultati pospešene stabilnostne študije. Pri pospešenih pogojih se je delež oQ10 v trdih kapsulah zelo znižal, še posebej pri izdelku G, vendar ne tako zelo kot v mehkih kapsulah. Tako bi lahko sklepali, da naša domneva o večji stabilnosti oQ10 v trdih kapsulah ne drži, vendar moramo upoštevati še stabilnost skupnega Q10. Vsebnost skupnega Q10 se je v pospešeni stabilnostni študiji najbolj znižala ravno v trdih kapsulah (F in G), kar lahko vidimo na Sliki 15. To je nepričakovano, tudi pri izdelku G, ki mu je rok uporabnosti potekel pred začetkom študije, saj se vsebnost skupnega Q10 pri nobenih drugih testiranih izdelkih ni tako znižala. Eden od

možnih razlogov je, da so ovojnice trdih kapsul manj primerne za zaščito snovi v svoji notranjosti pri povišani temperaturi in vlažnosti kot ovojnice mehkih kapsul. Verjetno bi bil Q10 v trdnih kapsulah tudi pri normalnih zunanjih pogojih shranjevanja skozi daljši čas povržen obsežni spremembi kot v primeru pospešenih pogojev, kar potrjujejo rezultati vsebnosti skupnega Q10 v časovni točki 0 tednov (Slika 7). Če pri vrednotenju stabilnosti oQ10 v trdnih kapsulah upoštevamo zmanjšanje vsebnosti oQ10 v trdnih kapsulah (Slika 14), lahko trdimo, da je znižanje vsebnosti oQ10 v pospešeni stabilnostni študiji posledica zmanjšanja skupne vsebnosti Q10 in ne samo nestabilnosti oQ10. Rezultati podpirajo domnevo, da je oQ10 pri izdelkih v obliki trdih kapsul bolj stabilna predvsem zato, ker Q10 in AK nimata ugodnih pogojev, da bi reagirala med seboj (ker sta v obliki prahu). Glede kakovosti oz. zagotavljanja dolgoročne stabilnosti oQ10 je takšna farmacevtska oblika ustrežnejša od tistih, v katerih so komponente že raztopljene. Pri Q10 pa je pri oblikovanju farmacevtskih oblik zelo pomembno, kako te vplivajo na njegovo absorpcijo, saj je znano, da se slabo absorbira. Zato je pomembno, da se učinkovina v prebavnem traktu raztopi hitro in v čim večjem deležu, kar pa se pri Q10 v obliki praška ne zgodi (4, 15).

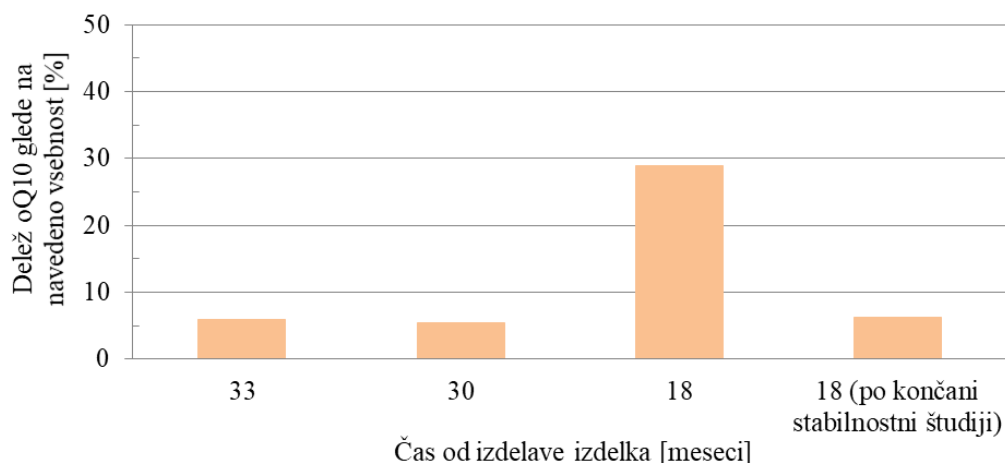


Slika 15: Vsebnost skupnega Q10 glede na njegovo začetno vsebnost v izdelkih z navedeno oQ10 in AK

Na osnovi rezultatov pospešene stabilnostne študije lahko prej opazimo razlike v stabilnosti Q10 v primerjavi s testiranjem pri predvidenih pogojih shranjevanja. Za potrditev, da se vsebnost oQ10 v izdelkih z navedeno oQ10 in AK v daljšem časovnem obdobju zniža tudi pri pogojih shranjevanja, smo dodatno testirali še 2 izdelka z različno dolгим obdobjem od

njune izdelave. Spreminjanje vsebnosti Q10 s časom smo testirali na izdelku D, pri katerem smo vedeli, koliko časa je poteklo od njegove izdelave, saj je šlo za zdravilo. Pri zdravilih zraven datuma izteka roka uporabnosti namreč poznamo tudi rok uporabnosti, torej časovno obdobje od datuma izdelave, v katerem zdravilo še ustreza zahtevam varnosti, kakovosti in učinkovitosti (83). Pri prehranskih dopolnilih navadno poznamo le datum izteka roka uporabnosti, ne vemo pa, koliko časa je poteklo od njegove izdelave, saj tega podatka proizvajalci niso dolžni navesti. V času, ki ga proizvajalec določi kot rok uporabnosti, mora biti prehransko dopolnilo še ustrezne kakovosti, če je bilo shranjeno pod zahtevanimi pogoji (84).

Izdelki D se niso razlikovali v vsebnosti skupnega Q10 (vsebnost je bila enaka tudi pri tistih dveh s pretečenim rokom uporabnosti), ki je bila pri vseh okrog 105 % (D1: 105,9 %, D2: 107,5 %, D3: 104,0 %). Torej tudi po pretečenem roku uporabnosti ustrezajo zahtevam glede vsebnosti skupnega Q10 po USP (med 90,0 % in 115,0 % navedene) (2). Na Sliki 16 so predstavljeni rezultati vsebnosti oQ10 glede na navedeno vsebnost te oblike. Vidimo, da je oQ10 v tem izdelku zelo nestabilna že pri predvidenih pogojih shranjevanja, saj je njena vsebnost zelo nizka že v izdelku z veljavnim rokom uporabnosti (starost izdelka 18 mesecev). V okviru pospešene stabilnostne študije se je vsebnost oQ10 v izdelku D1 znižala na vrednost, ki jo imajo enaki izdelki s pretečenim rokom uporabnosti.



Slika 16: Delež oQ10 glede na navedeno vsebnost Q10 v različnih izdelkih D

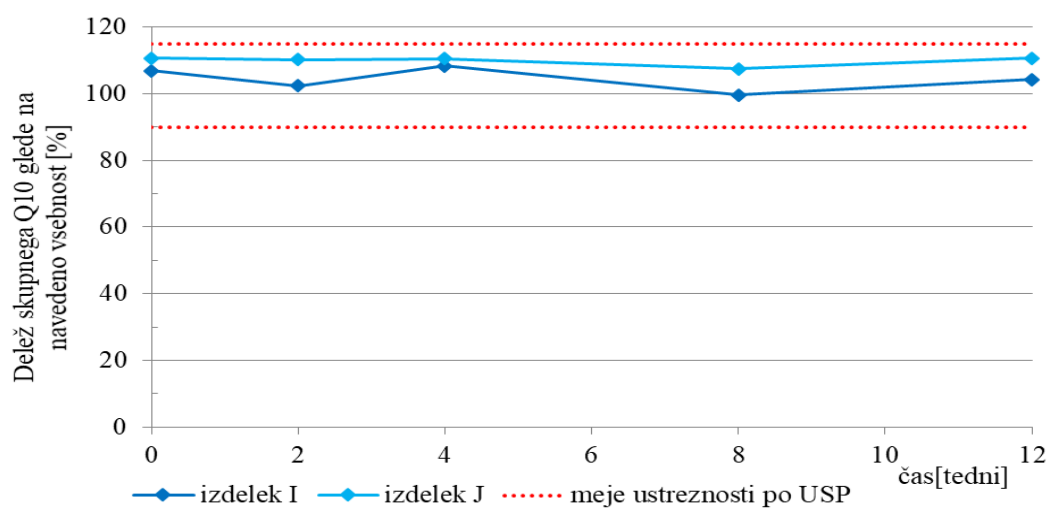
V prihodnje bi bilo smiselno izmeriti vsebnost Q10 v izdelku D takoj po izdelavi oz. v serijah z manjšo starostjo izdelka. Tako bi videli, ali je bila v izdelku že na začetku velika vsebnost rQ10 oz. koliko časa od datuma proizvodnje še prevladuje oQ10. Prav tako bi bilo dobro izmeriti še dejansko vsebnost AK v izdelkih iz te skupine, da bi lahko tudi kvantitativno

ovrednotili njen vpliv na stabilnost oQ10. Ker veliko izdelkov zraven AK vsebuje še druge antioksidante, bi bilo smiselno preveriti, ali kateri izmed njih tudi vpliva na stabilnost oQ10.

4.5.4 Vsebnost skupnega Q10

Vsebnost skupnega Q10 se je znižala do 10 % pri večini izdelkov (Slike 11, 13 in 15), le pri dveh je bil obseg spremembe večji (izdelka F in G). To je najverjetneje povezano s tem, da sta izdelka F in G tudi edina v obliki trdih kapsul. Rezultati vsebnosti skupnega Q10 v ostalih izdelkih kažejo, da pri znižanju vsebnosti posamezne oblike Q10 ne gre za nestabilnost oQ10 oz. rQ10 v klasičnem smislu (razpad), temveč da se obliki pretvarjata ena v drugo. Vsebnost skupnega Q10 se namreč le malo spreminja. Vpliva AK na stabilnost skupnega Q10 nismo opazili.

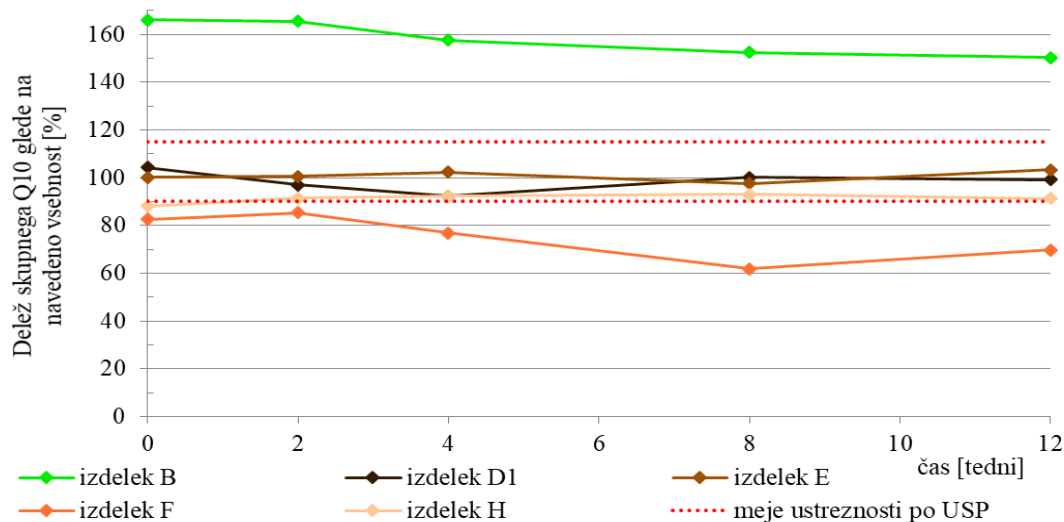
Pri vrednotenju vsebnosti skupnega Q10 v 1. časovni točki (Poglavje 4.3.3) je 6 izdelkov ustrezalo zahtevam vsebnosti skupnega Q10 po USP (A, C, D1, E, I in J), izdelek B je imel vsebnost preseženo (več od 115,0 %), pri 3 izdelkih pa je bila vsebnost pod mejo 90 % (F, G in H). Zanimalo nas je, ali bo vsebnost skupnega Q10 pri prvih 6 izdelkih še ustrezala zahtevam USP po koncu pospešene študije stabilnosti. Iz Slike 17 vidimo, da oba izdelka z navedeno rQ10 tudi na koncu pospešene stabilnostne študije ustrezata zahtevam vsebnosti skupnega Q10, saj je ta znotraj predpisanih mej (blizu 100 %).



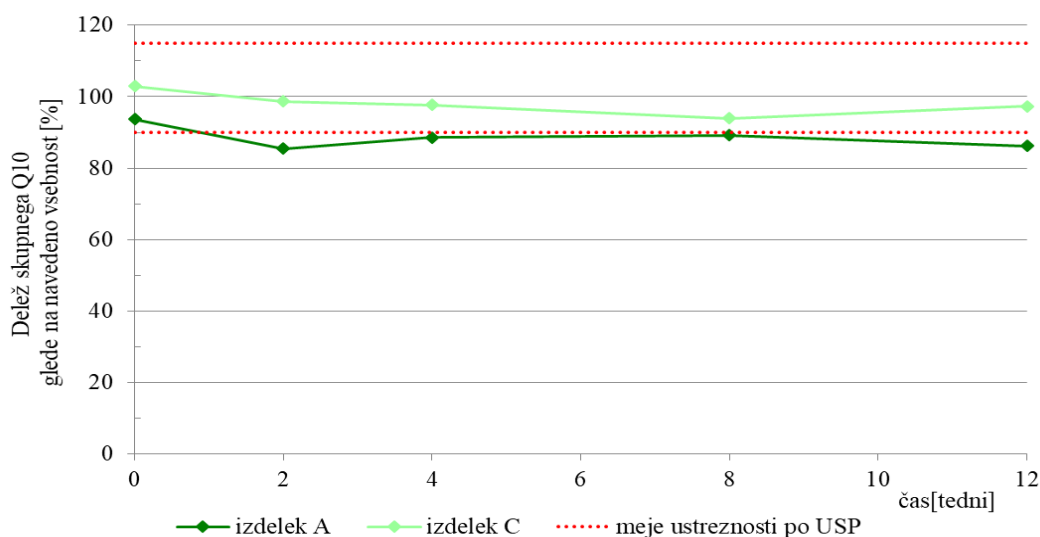
Slika 17: Delež skupnega Q10 glede na navedeno vsebnost v izdelkih z navedeno rQ10

Izdelke z navedeno oQ10 smo prikazali v dveh grafih: na Sliki 18 so izdelki z navedeno vsebnostjo 30 mg Q10, na Sliki 19 sta izdelka z navedeno vsebnostjo 50 mg. Iz primerjave smo izključili izdelek G, pri katerem je bila navedena vsebnost 10 mg Q10 (vsebnost skupnega Q10 je bil neustrezna že na začetku pospešene stabilnostne študije; Slika 7). Morda

odstopa tudi zato, ker je edini s tako nizko vsebnostjo skupnega Q10 na enoto izdelka. Med izdelki s 30 mg Q10 (Slika 18) je imel izdelek B po končani stabilnostni študiji še vedno zelo preseženo vsebnost skupnega Q10, ki je v času študije počasi padala. Izdelku F se je vsebnost skupnega Q10 zelo znižala. Ostali izdelki so še ustrezni. Obema izdelkoma s 50 mg Q10 se je vsebnost počasi nižala (Slika 19). Pri izdelku C je ostala nad 90,0 %, pri izdelku A pa se je znižala pod to mejo. Razlik v stabilnosti skupnega Q10 med izdelki z navedeno vsebnostjo 30 mg in 50 mg Q10 nismo opazili.



Slika 18: Delež skupnega Q10 glede na navedeno vsebnost v izdelkih z navedeno vsebnostjo 30 mg Q10



Slika 19: Delež skupnega Q10 glede na navedeno vsebnost v izdelkih z navedeno vsebnostjo 50 mg

Pri zagotavljanju kakovosti prehranskih dopolnil s Q10 po predpisih USP morajo ta ustrezati kriterijem le v vsebnosti skupnega Q10 (2). Po teh kriterijih sta bila tudi izdelka D1 in E ustrezna glede vsebnosti skupnega Q10, čeprav sta imela zelo nizko vsebnost navedene oblike Q10. Pri izdelku D1 je torej navedena napačna oblika Q10, medtem ko je vsebnost skupnega Q10 tudi na koncu trimesečne pospešene stabilnostne študije še vedno približno 100 % (Slika 18). Pri izdelku E je Q10 naveden kot "koencim Q10", kar lahko predstavlja tudi skupen Q10. V tem primeru izdelek E tudi po koncu pospešene stabilnostne študije ustreza zahtevam USP glede vsebnosti skupnega Q10. Testirani izdelki z navedeno oQ10 so v smislu "učinkovitosti" torej celo boljši od "navedenih", ker vsebujejo več rQ10. Zadnje raziskave namreč kažejo, da ima rQ10 prednost pred oQ10 zaradi večje biološke uporabnosti (10, 17). Ampak ker rQ10 ni navedena na ovojnicini, se izdelek ne ujema s svojo predstavitvijo. V takih primerih je smiselno, da proizvajalec ne definira oblike Q10, ki je prisotna v izdelku, če ta ni dovolj stabilna do konca roka uporabnosti.

5 SKLEP

Preverili smo ustreznost uporabe treh analiznih metod, ki so bile že predhodno razvite, za merjenje vsebnosti Q10 v 10 izdelkih za peroralno uporabo v obliki mehkih in trdih kapsul, ki so na voljo v Sloveniji (zdravilo in prehranska dopolnila). Metoda za ugotavljanje vsebnosti obeh posameznih oblik Q10 (oksidirane in reducirane) je bila primerna. Ostali dve metodi, ki v postopku priprave vzorca za analizo vključujeta še oksidacijo oz. redukcijo Q10, smo optimizirali (sprememba topila za raztapljanje v zadnjem koraku priprave vzorcev za analizo).

Izbran kromatografski sistem je primeren za merjenje vsebnosti rQ10, oQ10 in skupnega Q10. Ima ustrezno selektivnost (pri retencijskih časih rQ10 in oQ10 ni interferenc), linearnost ($R^2 \geq 0,999$), točnost (95 – 105 %) in natančnost ($RSD < 5 \%$).

Z uporabo izbranih metod dobimo enakovredne rezultate vsebnosti skupnega Q10, kar smo preverili z merjenjem vsebnosti skupnega Q10 v šestih izdelkih z visoko, srednjo ali nizko vsebnostjo oQ10 oz. rQ10 in dokazali s statističnim testom. Potrdili smo tudi ponovljivost priprave vzorca ($RSD < 5 \%$).

Vsebnost oQ10, rQ10 in skupnega Q10 v izdelkih glede na navedeno vsebnost smo vrednotili s kriteriji po USP (90,0 % - 115,0 %). Ugotovitve smo preverili z izvedbo pospešene stabilnostne študije pri 40 °C in 75 % relativne vlažnosti, ki je trajala tri mesece.

- Vsebnost rQ10 je bila znotraj postavljenih mej pri obeh izdelkih, ki imata navedeno rQ10. V testiranih izdelkih je rQ10 torej ustrezno stabilizirana, čeprav velja za manj stabilno obliko Q10, saj se tudi v pospešeni stabilnostni študiji vsebnost rQ10 glede na njeno začetno vrednost ni bistveno znižala (do 10 %). Da bi zagotovili večjo reprezentativnost rezultatov, bi bilo v prihodnje smiselno analizirati vsebnost večjemu številu izdelkov z navedeno rQ10, ki pa jih je na slovenskem tržišču relativno malo.

- Vsebnost navedene oQ10 je bila znotraj postavljenih mej pri dveh izdelkih od skupno osmih testiranih. V večini izdelkov v obliki mehkih kapsul je bil oQ10 ob prisotnosti AK manj stabilen. Ker se je vsebnost skupnega Q10 le malo znižala, predpostavljamo, da gre pri nestabilnosti oQ10 za pretvarjanje v rQ10. Z merjenjem vsebnosti Q10 v enakih izdelkih z različno dolgim časom od njihove izdelave smo potrdili stabilnost skupnega Q10 in nestabilnost oQ10 ob prisotnosti AK tudi pri sobnih pogojih. Rezultati eksperimentalnega

dela kažejo, da AK pospeši pretvarjanje oQ10 v rQ10, vendar k pretvorbi prispevajo tudi drugi dejavniki, saj je bil delež rQ10 visok tudi v enem izdelku brez AK. Vsebnost oQ10 je v tem izdelku hitro padala tudi v pospešeni stabilnostni študiji. Vzrok za to bi lahko bile ostale snovi v izdelku, kar bi bilo v prihodnje smiselno preveriti.

- V izdelkih z navedeno oQ10 in AK, ki sta bila v obliki trdih kapsul, nismo opazili vpliva AK na stabilnost oQ10. Takšne farmacevtske oblike so z vidika zagotavljanja stabilnosti oQ10 primerne, vendar zaradi nizke absorpcije Q10 iz prebavnega trakta niso zaželeni. Prav tako je ta oblika manj primerna pri zagotavljanju stabilnosti skupnega Q10 v izdelkih, saj se je vsebnost skupnega Q10 v trdih kapsulah izraziteje znižala kot pri mehkih kapsulah.

- Vsebnost skupnega Q10 je bila ustrezna pri šestih izdelkih od desetih. En izdelek je imel vsebnost zelo preseženo (166,0 % navedene vsebnosti), pri treh je bila vsebnost nekoliko nižja od 90,0 %. Vsi izdelki, ki niso ustrezali postavljenim kriterijem, so bili prehranska dopolnila. Če pri vrednotenju vsebnosti oQ10 nismo upoštevali navedene oblike, temveč samo vsebnost skupnega Q10, kot je zapisano v USP, so bili ustrezni štirje izdelki z navedeno oQ10 od osmih testiranih.

Za kvantitativno vrednotenje vpliva AK na stabilnost oQ10 bi bilo potrebno zraven vsebnosti Q10 meriti še vsebnost AK v izdelkih. Prav tako bi bilo smiselno preučiti vpliv ostalih snovi na stabilnost posameznih oblik Q10, predvsem različnih podlag in reducentov, ki so pogosti v izdelkih s Q10. Različne snovi lahko pospešijo pretvarjanje oblik iz ene v drugo, v izdelkih s Q10 večinoma redukcijo oQ10 v rQ10. S stališča kakovosti je prisotnost obeh oblik Q10 neprimerna, če je navedena samo ena. Vendar so izdelki zaradi večje biološke uporabnosti rQ10 celo boljši, kot če bi vsebovali samo oQ10. Zaradi zagotavljanja kakovosti bi bilo smiselno, da bi izdelkom s Q10 vrednotili tako vsebnost skupnega kot vsebnost posamezne oblike Q10.

6 LITERATURA

1. Acosta M. J., Vazquez Fonseca L., Desbats M. A., Cerqua C., Zordan R., Trevisson E., Salviati L.: Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 2016; 1857 (8): 1079–1085.
2. United States Pharmacopeial Convention: Dietary Supplements/Ubidecarenone. V: United States Pharmacopeia 36: National Formulary 31, 1 supplement. Rockville, Md., United States Pharmacopeial Convention, 2013: 1613–1616.
3. Hernández-Camacho J. D., Bernier M., López-Lluch G., Navas P.: Coenzyme Q10 Supplementation in Aging and Disease. *Frontiers in Physiology*, 2018; 9 : članek 44.
4. Žmitek J., Žmitek K.: Koencim Q10 kot prehransko dopolnilo in zdravilo. *Farmacevtski vestnik*, 2009; 60 (3): 150–157.
5. Ernster L., Dallner G.: Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1995; 1271 (1): 195–204.
6. Obreza A., Humar M., Šmid-Korbar J., Janeš D., Razinger-Mihovec B., Frankič D., Kosirnik B., Lunder M., Jeras M., Marc J., Gašperlin M., Baumgartner S., Kos M., Mrhar A., Černe D., Švajger B., Hribar M., Tomazin E., Božič B., Marinko P., Kreft S., Vučko Mole S.: Vitamin. V: *Farmacevtski terminološki slovar*. Ljubljana, Založba ZRC, 2013. Dostopno: <https://isjfr.zrc-sazu.si/sl/terminologisce/slovarji/farmacevtski/iskalnik?iztocnica=vitamin#v> [25. 3. 2018].
7. Pečar S., Mravljak J., Anderluh M., Gašperlin M., Grubič Z., Krbavčič A., Plesničar B., Štrukelj B.: Koencim Q. V: *Šumi življenja ali Radikali in druge reaktivne snovi v telesu*. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo, 2015: 168–169.
8. Rus P., Rus R.: Koencim Q 10. *Zdravstveno varstvo*, 2008; 47 (2): 89–98.
9. Turunen M., Olsson J., Dallner G.: Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2004; 1660 (1–2): 171–199.
10. Bhagavan H. N., Chopra R. K.: Plasma coenzyme Q10 response to oral ingestion of coenzyme Q10 formulations. *Mitochondrion*, 2007; 7 : S78–S88.
11. NIJZ: Ocena tveganja za zdravje ljudi v povezavi z uživanjem prehranskih dopolnil, ki vsebujejo več kot 50mg koencima Q10 v dnevnem odmerku. Dostopno: http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/q10-mzirs_2015_03_splet_0.pdf [26. 3. 2018].
12. Niklowitz P., Onur S., Fischer A., Laudes M., Palussen M., Menke T., Döring F.: Coenzyme Q10 serum concentration and redox status in European adults: influence of age, sex, and lipoprotein concentration. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2016; 58 (3): 240–245.
13. Pavlin R.: Koencim Q10 - klinična raba. *Zdravniški vestnik*, 2008; 77 (2): 159–162.
14. Yubero D., Montero R., Artuch R., Land J. M., Heales S. J. R., Hargreaves I. P.: Biochemical Diagnosis of Coenzyme Q10 Deficiency. *Molecular Syndromology*, 2014; 5 (3–4): 147–155.
15. Bhagavan H. N., Chopra R. K., Craft N. E., Chitchumroonchokchai C., Failla M. L.: Assessment of coenzyme Q10 absorption using an in vitro digestion-Caco-2 cell model. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007; 333 (1–2): 112–117.
16. Miles M. V.: The uptake and distribution of coenzyme Q(10). *Mitochondrion*, 2007; 7 : S72–S77.
17. Miles M. V., Horn P., Miles L., Tang P., Steele P., DeGrauw T.: Bioequivalence of coenzyme Q10 from over-the-counter supplements. *Nutrition Research*, 2002; 22 (8): 919–929.
18. European Responsible Nutrition Alliance: Coenzyme Q10. V: *Facts about vitamins, minerals and other food components with health effects*. Belgium, ERNA, 2011: 90–93. Dostopno: <http://www.foodsupplementseurope.org/sites/0023/uploads/content/publications/facts-about-vitamins-minerals.pdf?1407341716> [28. 3. 2018].
19. Evans M., Baisley J., Barss S., Guthrie N.: A randomized, double-blind trial on the bioavailability of two CoQ10 formulations. *Journal of Functional Foods*, 2009; 1 (1): 65–73.
20. Boyer R., Abram V.: Verige za prenos elektronov in nastanek ATP. V: *Temelji biokemije*. Ljubljana, Študentska založba, 2005: 450–462.

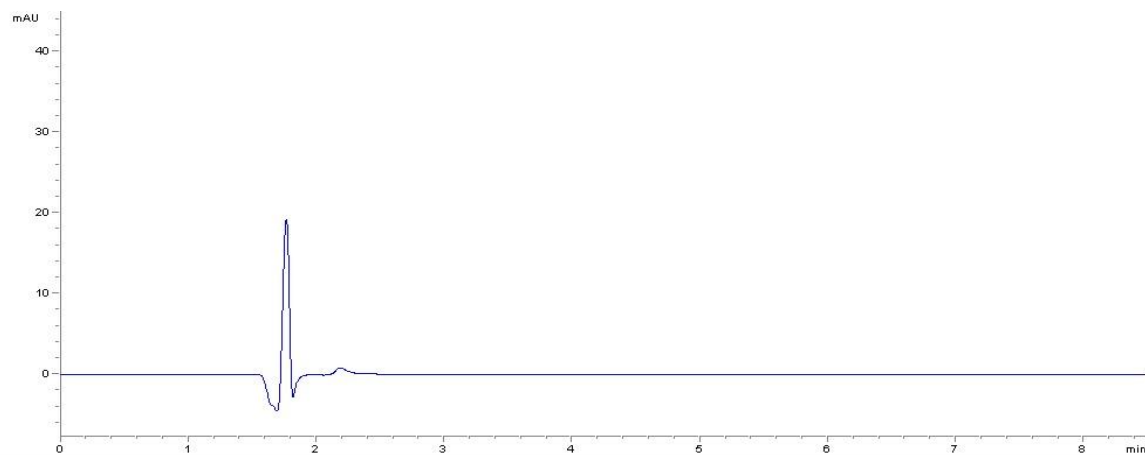
21. Niklowitz P., Fischer A., Onur S., Paulussen M., Menke T., Döring F.: Smoking habits and coenzyme Q10 status in healthy European adults. *Archives of Medical Science*, 2016; 4 : 715–720.
22. Kubo H., Fujii K., Kawabe T., Matsumoto S., Kishida H., Hosoe K.: Food content of ubiquinol-10 and ubiquinone-10 in the Japanese diet. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008; 21 (3): 199–210.
23. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA): Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to coenzyme Q10 and contribution to normal energy-yielding metabolism (ID 1508, 1512, 1720, 1912, 4668), maintenance of normal blood pressure (ID 1509, 1721, 1911), protection of DNA, prote: Coenzyme Q10 related health claims. *EFSA Journal*, 2010; 8 (10): 1793.
24. EMA Committee for Orphan Medicinal Products: Ubiquinol for the treatment of primary coenzyme Q10 deficiency syndrome. Dostopno: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2016/11/WC500216133.pdf [26. 3. 2018].
25. Vovk T., Obreza A.: Koencim Q10. V: Prehranska dopolnila I: minerali in vitamini : podiplomsko izobraževanje. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, 2009: 122–124.
26. Oertel W., Schulz J. B.: Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. *Journal of Neurochemistry*, 2016; 139 : 325–337.
27. Pravst I., Žmitek K.: The coenzyme Q10 content of food supplements. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2011; 6 (4): 457–463.
28. RS Ministrstvo za zdravje: Napotki v pomoč za lažje in boljše razumevanje zakonodaje o prehranskih dopolnilih. Dostopno: http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/mz_dokumenti/zakonodaja/varnost_hrane/splosna_zakonodaja/napotki-prehranska_dopolnila.pdf [28. 3. 2018].
29. Zakon o zdravilih (ZZdr-2). Uradni list RS, št. 17/14.
30. Centralna baza zdravil: Zdravila z ubidekarenonom. Dostopno: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search?SearchView&Query=\(%5BSEZNAMUCINKNAZIV%5D=_ubidekarenon*\)&SearchOrder=4&SearchMax=301](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search?SearchView&Query=(%5BSEZNAMUCINKNAZIV%5D=_ubidekarenon*)&SearchOrder=4&SearchMax=301) [6. 6. 2018].
31. Pravilnik o prehranskih dopolnilih. Uradni list RS, št. 66/13.
32. Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili. Uradni list RS, št. 52/00, 42/02 in 47/04 – ZdPZ.
33. RS Ministrstvo za zdravje: Napotki glede področja prehranskih dopolnil v Republiki Sloveniji in skladnosti tovrstnih izdelkov z veljavno zakonodajo. Dostopno: http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/javno_zdravje_2014/Napotki_PD__DEC__2014mojca_triler.pdf [28. 3. 2018].
34. RS Ministrstvo za zdravje: Seznam prijavljenih prehranskih dopolnil, ki se prvič dajejo v promet v Republiki Sloveniji. Dostopno: http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/mz_dokumenti/zakonodaja/varnost_hrane/register_preh.dopolnila/SEZNAM_prehranskih_dopolnil_27.02.2013.pdf [6. 6. 2018].
35. Ars Pharmae Kardio3aktiv. Dostopno: <https://www.lekarnar.com/izdelki/ars-pharmae-kardio3aktiv-mehke-kapsule> [6. 6. 2018].
36. Blooms CoQ10 Aquacelle. Dostopno: <https://www.lekarnar.com/izdelki/blooms-q10-aquacelle-kapsule> [6. 6. 2018].
37. Medilek Statinix. Dostopno: <https://www.lekarnar.com/izdelki/medilek-statinix-30-kapsul> [6. 6. 2018].
38. NICApur mediBalance Stat. Dostopno: <https://www.lekarnar.com/izdelki/nicapur-medibalance-stat-kapsule> [6. 6. 2018].
39. Phytogarda Vitadyn Gold. Dostopno: <https://www.lekarnar.com/izdelki/phytogarda-vitadyn-gold-vrecke> [6. 6. 2018].
40. Q10 koencim mladosti. Dostopno: <https://www.sensilab.si/q10-koencim-mladosti-2x> [6. 6. 2018].

41. Supradyn® energija. Dostopno: <http://www.supradyn.si/sl/program-supradyn/supradyn-energija/supradyn-energija-filmsko-oblozene-tablete-30/> [6. 6. 2018].
42. Koencim Q10 Terranova. Dostopno: <https://www.sanolabor.si/si/prehranska-dopolnila/koencim-q10-terranova-50-kapsul> [6. 6. 2018].
43. Valens Quvital Q10. Dostopno: <https://www.lekarnar.com/izdelki/valens-quvital-q10-prsilo-z-okusom-ananasa> [6. 6. 2018].
44. Quvital® Q10 Forte sirup. Dostopno: <https://www.lekarnar.com/izdelki/quvital-forte-sirup-z-vitaminoma-b1-in-b2-okus-jabolka> [6. 6. 2018].
45. NIJZ: Povezava med zdravjem in prehrano – funkcionalna živila. Dostopno: <http://www.nijz.si/sl/povezava-med-zdravjem-in-prehrano-funkcionalna-zivila> [6. 6. 2016].
46. NIJZ: Odnos potrošnikov do funkcionalnih živil. Dostopno: <http://www.nijz.si/sl/odnos-potrošnikov-do-funkcionalnih-zivil> [6. 6. 2018].
47. Ego Slim & Vital. Dostopno: <https://www.l-m.si/izdelki/ego/> [6. 6. 2018].
48. Uredba komisije (EU) št. 432/2012 o seznamu dovoljenih zdravstvenih trditev na živilih, razen trditev, ki se nanašajo na zmanjšanje tveganja za nastanek bolezni ter na razvoj in zdravje otrok.
49. Commission of the European Communities: Other substances sometimes considered to be of nutritional importance. V: Reports of the Scientific Committee for Food: nutrient and energy intakes for the european community. Luxembourg, Commission of the European Communities, Directorate-General Telecommunications, Information Industries and Innovation, 1993: 224. Dostopno: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out89.pdf [27. 3. 2018].
50. JAZMP: Smernice za opredelitev izdelkov, ki lahko hkrati sodijo v opredelitev zdravila in izdelka, ki je predmet drugih predpisov za uporabo pri ljudeh. Dostopno: http://www.jazmp.si/fileadmin/datoteke/dokumenti/SRZHPD/Smernice_za_opredelitev_izdelkov_marec_2018.pdf [26. 3. 2018].
51. Pharmaceutical and medical device regulatory science society of Japan: Official Monographs/Ubidecarenone. V: Japanese Pharmacopoeia English Translation. 17. izd. S.I., Yakuji Nippo-SHA, 2016: 1743–1744. Dostopno: <https://www.pmda.go.jp/files/000217655.pdf> [25. 3. 2018].
52. Council of Europe: Ubidecarenone. V: European Pharmacopoeia 8.0: Vol-2. Strasbourg, Council of Europe, 2013: 3507–3508.
53. Abdel-Kader M. S., Alam P., Alqasoumi S. I.: Densitometric HPTLC method for qualitative, quantitative analysis and stability study of Coenzyme Q10 in pharmaceutical formulations utilizing normal and reversed-phase silica gel plates. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016; 29 (2): 477–484.
54. Putanec J.: Vrednotenje oksidativne nestabilnosti ubidekarena z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Diplomsko naloga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012.
55. Claessens A. J., Yeung C. K., Risler L. J., Phillips B. R., Himmelfarb J., Shen D. D.: Rapid and sensitive analysis of reduced and oxidized coenzyme Q10 in human plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and application to studies in healthy human subjects. Annals of Clinical Biochemistry, 2016; 53 (2): 265–273.
56. Lucangioli S., Martinefski M., Tripodi V.: Coenzyme Q10 analytical determination in biological matrices and pharmaceuticals. Frontiers in Bioscience (Scholar Edition), 2016; 8 : 321–330.
57. Kettawan A., Kunthida C., Takahashi T., Kishi T., Chikazawa J., Sakata Y., Yano E., Watabe K., Yamamoto Y., Okamoto T.: The quality control assessment of commercially available coenzyme q(10)-containing dietary and health supplements in Japan. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2007; 41 (2): 124–131.
58. Premzl K.: Študij nezdružljivosti ubidekarena in askorbinske kisline v mehkih želatinastih kapsulah. Magistrska naloga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012.

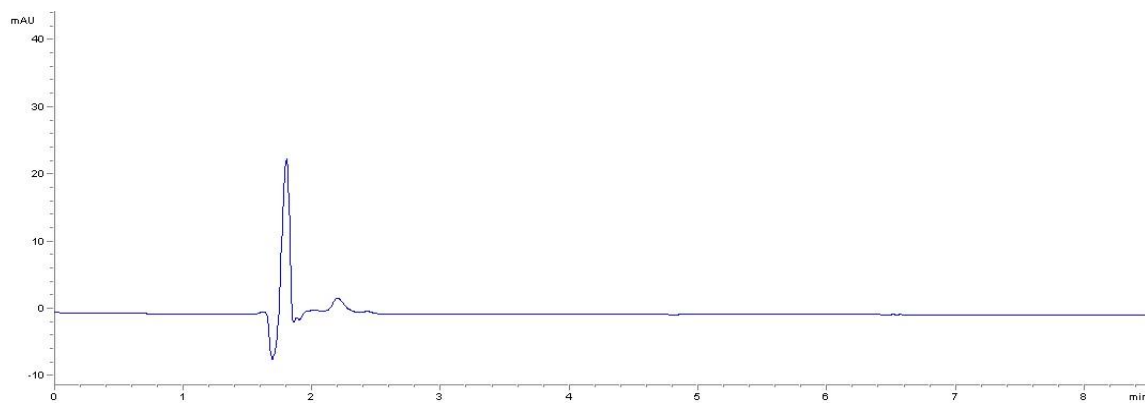
59. Žmitek J., Šmidovnik A., Fir M., Prošek M., Žmitek K., Walczak J., Pravst I.: Relative Bioavailability of Two Forms of a Novel Water-Soluble Coenzyme Q10. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2008; 52 (4): 281–287.
60. RS Ministrstvo za zdravje: Raziskava javnega mnenja o uporabi prehranskih dopolnil. Dostopno: http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/zakonodaja/mednarodna_zakonodaja/VARNOST_%C5%BDIVIL/PARSIFAL-porocilo_raziskave.pdf [28. 3. 2018].
61. Rodríguez-Aguilera J., Cortés A., Fernández-Ayala D., Navas P.: Biochemical Assessment of Coenzyme Q10 Deficiency. *Journal of Clinical Medicine*, 2017; 6 (3): članek 27.
62. Council of Europe: Ubidecarenon. V: *European Pharmacopoeia 9.0: Vol-2*. Strasbourg, Council of Europe, 2017: 5697–5699.
63. Lunetta S., Roman M.: Determination of coenzyme Q10 content in raw materials and dietary supplements by high-performance liquid chromatography-UV: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 2008; 91 (4): 702–708.
64. Lu W.-L., Zhang Q., Lee H.-S., Zhou T.-Y., Sun H.-D., Zhang D.-W., Zheng L., Lee M., Wong S.-M.: Total coenzyme Q10 concentrations in Asian men following multiple oral 50-mg doses administered as coenzyme Q10 sustained release tablets or regular tablets. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2003; 26 (1): 52–55.
65. Tang P. H., Miles M. V., DeGrauw A., Hershey A., Pesce A.: HPLC analysis of reduced and oxidized coenzyme Q(10) in human plasma. *Clinical Chemistry*, 2001; 47 (2): 256–265.
66. Temova Rakuša Ž., Srečnik E., Roškar R.: Novel HPLC-UV Method for Simultaneous Determination of Fat-soluble Vitamins and Coenzyme Q10 in Medicines and Supplements. *Acta Chimica Slovenica*, 2017; 64 (3): 523–529.
67. Clementino A., Sonvico F.: Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous detection and quantification of simvastatin's isoforms and coenzyme Q10 in lecithin/chitosan nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018; 155 : 33–41.
68. Saravanan V. S., Revathi R., Meera N. V.: Method development and validation for the simultaneous estimation of lycopene and ubidecarenone by RP-HPLC in combined pharmaceutical dosage form. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2016; 6 (5): 46–51.
69. Prošek M., Butinar J., Lukanc B., Fir M. M., Milivojevic L., Krizman M., Šmidovnik A.: Bioavailability of water-soluble CoQ10 in beagle dogs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008; 47 (4–5): 918–922.
70. Tang Z., Li S., Guan X., Schmitt-Kopplin P., Lin S., Cai Z.: Rapid assessment of the coenzyme Q10 redox state using ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *The Analyst*, 2014; 139 (21): 5600–5604.
71. Artuch R., Brea-Calvo G., Briones P., Aracil A., Galván M., Espinós C., Corral J., Volpini V., Ribes A., Andreu A. L., Palau F., Sánchez-Alcázar J. A., Navas P., Pineda M.: Cerebellar ataxia with coenzyme Q10 deficiency: Diagnosis and follow-up after coenzyme Q10 supplementation. *Journal of the Neurological Sciences*, 2006; 246 (1–2): 153–158.
72. Mailvelan R., Mounnissamy V. M., Selvamani P., Rajesh J., Raviraj T.: Development and validation of UV spectrophotometric methods for the simultaneous estimation of ubidecarenone (coenzyme Q-10) and clomifene citrate in bulk and tablet dosage forms. *Asian Journal of Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, 2013; 1 (1): 23–30.
73. Bunaciu A. A., Aboul-Enein H. Y., Fleschin S.: FT-IR spectrophotometric analysis of coenzyme Q10 (CoQ10) and its pharmaceutical formulations. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2007; 37 (1): 59–65.
74. Lucangioli S., Flor S., Sabrina F., Contin M., Mario C., Tripodi V., Valeria T.: A capillary electrophoretic system based on a novel microemulsion for the analysis of coenzyme Q10 in human plasma by electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, 2009; 30 (11): 1899–1905.
75. Monakhova Y. B., Ruge I., Kuballa T., Lerch C., Lachenmeier D. W.: Rapid Determination of Coenzyme Q10 in Food Supplements Using ¹ H NMR Spectroscopy. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 2013; 83 (1): 67–72.

76. Michalkiewicz S.: Voltammetric determination of coenzyme Q10 in pharmaceutical dosage forms. *Bioelectrochemistry*, 2008; 73 (1): 30–36.
77. Rupali A., Sharmila P., Ranjana A.: Volumetric Method for Determination of Coenzyme Q10 in Pharmaceutical Samples with Ascorbic Acid. *Journal of Chemistry and Chemical Sciences*, 2010; 1 (1): 21–28.
78. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Fidi koencim 10 mehke kapsule. Dostopno: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/35DE6847F12C1CCDC12579C2003F60A3/\\$File/s-0571.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/35DE6847F12C1CCDC12579C2003F60A3/$File/s-0571.pdf) [6. 6. 2018].
79. Srečnik E.: Vrednotenje vsebnosti in stabilnosti lipofilnih vitaminov in koencima Q10 v zdravilih in prehranskih dopolnilih z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Magistrska naloga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2017.
80. EMA: Specifications and control tests on the finished product. Dostopno: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003368.pdf [6. 6. 2018].
81. Pravst I., Blaznik U., Krbavčič A., Kreft S., Kušar A., Mičović E., Razinger-Mihovec B., Recek M., Repe J., Rogelj I., Stibilj V.: Priporočila za zagotavljanje kakovosti prehranskih dopolnil. *Farmacevtski vestnik*, 2012; 63 (4): 216–224.
82. Life Science Outsourcing, Inc.: Accelerated Aging. Dostopno: <https://lso-inc.com/medical-package-testing/accelerated-aging.html> [6. 6. 2018].
83. Direktiva 2001/83/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 6. novembra 2001 o zakoniku Skupnosti o zdravilih za uporabo v humani medicini.
84. Uredba (EU) št. 1169/2011 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 25. oktobra 2011 o zagotavljanju informacij o živilih potrošnikom.

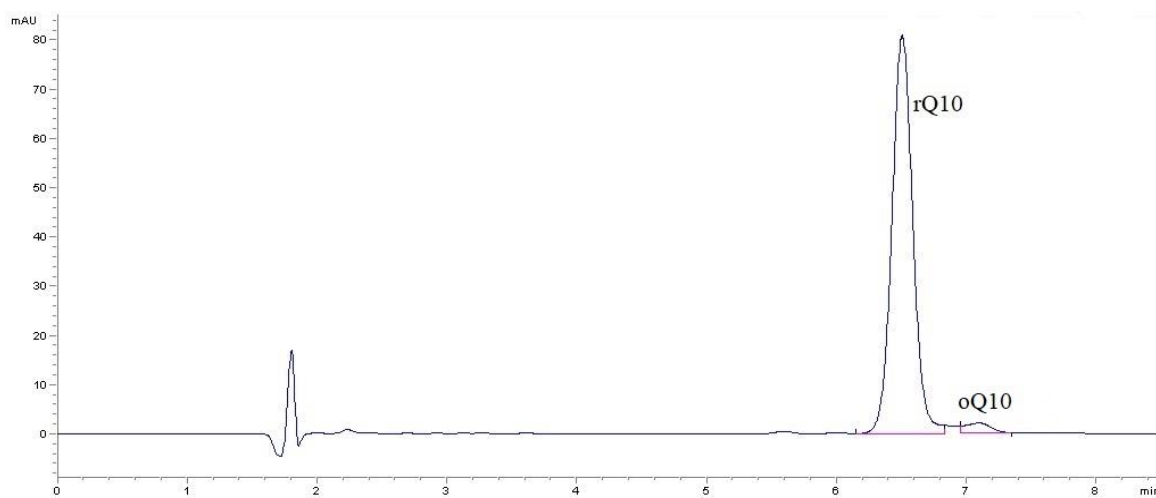
7 PRILOGE



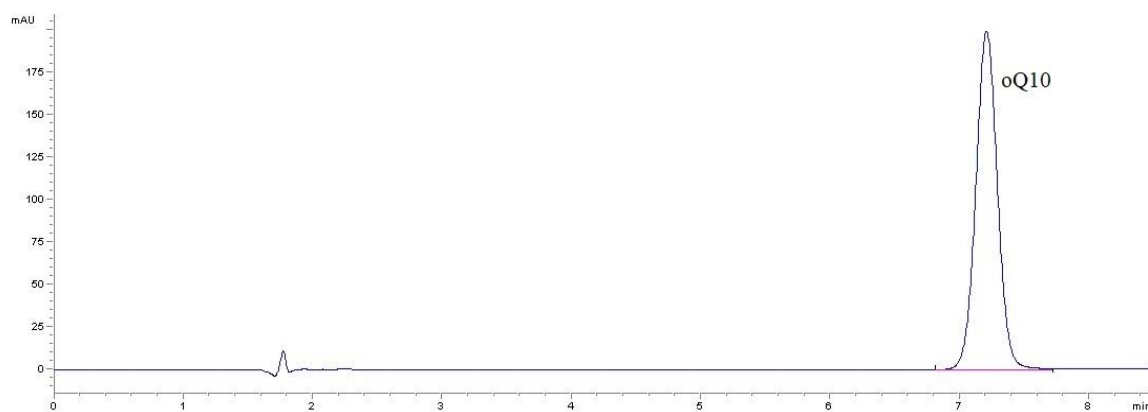
Slika 20: Kromatogram ACN



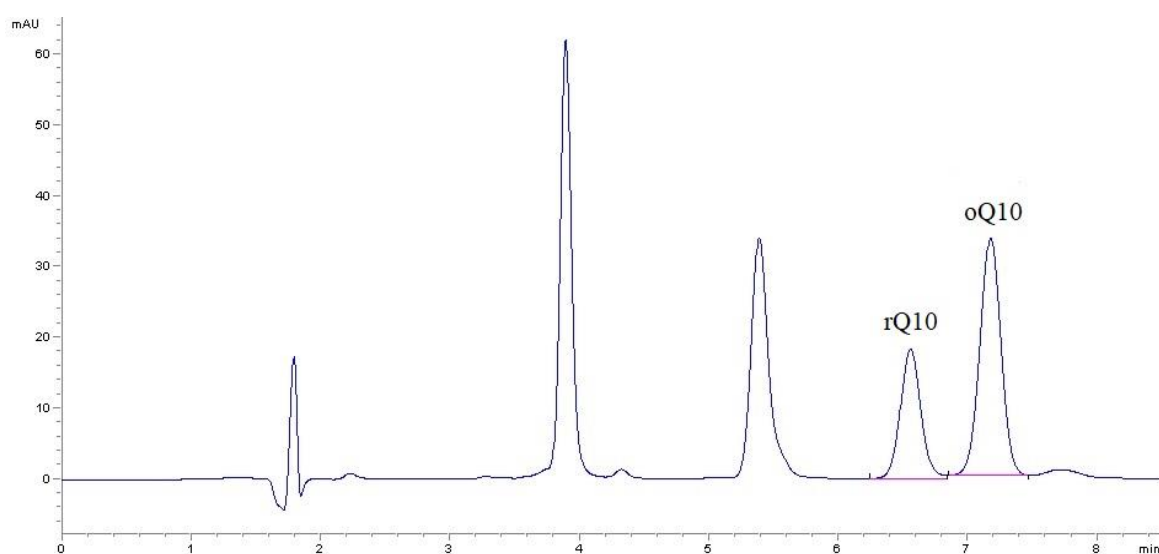
Slika 21: Kromatogram EtOH



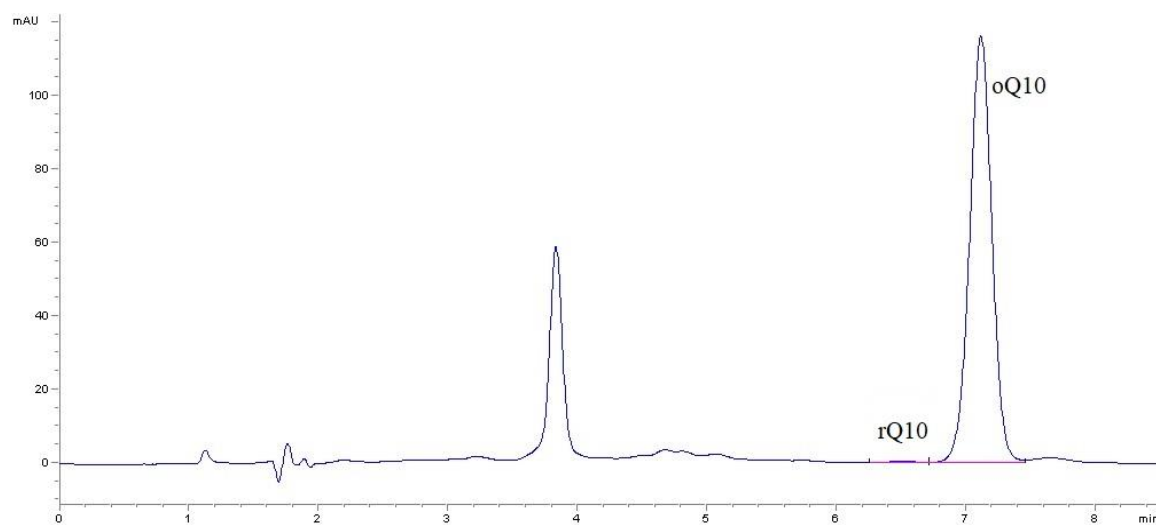
Slika 22: Kromatogram reduciranega standarda Q10 (rQ10) v ACN s koncentracijo 250



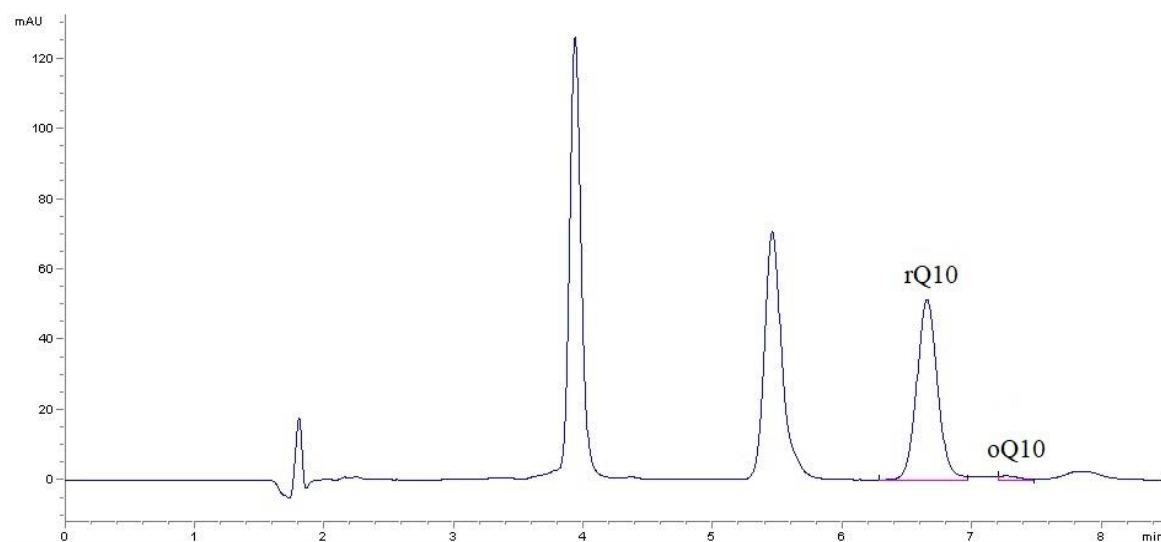
Slika 23: Kromatogram standarda oQ10 v ACN s koncentracijo 250 mg/l



Slika 24: Kromatogram vzorca D1, pripravljenega z metodo P (izhodiščna časovna točka)



Slika 25: Kromatogram vzorca D1, pripravljenega z metodo O (izhodiščna časovna točka)



Slika 26: Kromatogram vzorca D1, pripravljenega z metodo R (izhodiščna časovna točka)