

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMONA RAZPOTNIK

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni program farmacije

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMONA RAZPOTNIK

**DOLOČANJE VSEBNOSTI UBIDEKARENONA V MEHKIH
KAPSULAH Z METODO HPLC**

**DETERMINATION OF UBIDECARENONE IN SOFT
CAPSULES BY HPLC METHOD**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom docenta dr. Roberta Roškarja, mag. farm. in somentorstvom izrednega profesorja dr. Vojka Kmetca, mag. farm.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Robertu Roškarju in somentorju dr. Vojku Kmetcu za vse napotke in strokovne nasvete, ki so me vodili pri delu.

Zahvaljujem se vsem, ki so mi stali ob strani, me spodbujali in mi pomagali pri nastajanju diplomske naloge.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Roberta Roškarja in somentorstvom izr. prof. dr. Vojka Kmetca.

Simona Razpotnik

Predsednik diplomske komisije:

izr. prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm.

Član diplomske komisije:

doc. dr. Jožko Cesar, mag. farm.

Ljubljana, marec 2011

VSEBINA

VSEBINA	1
POVZETEK	2
SEZNAM OKRAJŠAV	3
1 UVOD	1
2 UBIDEKARENON	2
2.1 DELOVANJE KOENCIMA Q ₁₀	3
2.2 VIRI KOENCIMA Q ₁₀	4
2.3 VZROKI ZA POMANJKANJE	7
2.4 ABSORPCIJA IN PRESNOVA	8
2.5 VPLIV KOENCIMA Q ₁₀ PRI RAZLIČNIH BOLEZNIH	9
2.6 VARNOST UPORABE KOENCIMA Q ₁₀	14
3 ZAKONODAJA PREHRANSKIH DOPOLNIL IN ZDRAVIL	15
3.1 PREHRANSKA DOPOLNILA	17
3.2 ZDRAVILA	22
4 NAMEN DELA	26
5 MATERIALI IN METODE	27
5.1 MATERIALI	28
5.2 METODE	30
5.3 IZRAČUN IN STATISTIKA	38
6 REZULTATI	39
6.1 VPELJAVA HPLC METODE	39
6.2 VREDNOTENJE HPLC METODE	40
6.3 DOLOČANJE VSEBNOSTI KOENCIMA Q ₁₀	44
6.4 DOLOČANJE DELEŽA REDUCIRANE OBLIKE KOENCIMA Q ₁₀	48
7 RAZPRAVA	51
8 ZAKLJUČEK	57
9 LITERATURA	58

POVZETEK

Učinkovina ubidekarenon je bolj poznana pod imenom koencim Q₁₀. Uporabnikom je na voljo v hrani, prehranskih dopolnilih, zdravilih in kozmetičnih izdelkih. Med izdelki s koencimom Q₁₀ je najpogostejša formulacija oljna suspenzija koencima Q₁₀ v mehkih kapsulah, ki lahko imajo status zdravila ali prehranskega dopolnila. Zakonodajni predpisi za zdravila ali prehranska dopolnila se med seboj močno razlikujejo. Zaradi pogoste uporabe izdelkov, ki vsebujejo koencim Q₁₀, je preverjanje kakovosti še kako potrebno.

Za določanje vsebnosti proučevane spojine potrebujemo občutljive in selektivne analizne metode, ki so sposobne razlikovati med spojino in njej podobnimi molekulami (opisane v monografiji ubidekarenon evropske farmakopeje). Zato je bil namen našega dela izbrati ustrezno analitsko metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti in jo po potrebi prilagoditi za ugotavljanje vsebnosti ubidekarena v mehkih kapsulah. V okviru diplomske naloge smo preverili katere metode določanja koencima Q₁₀ v mehkih kapsulah so opisane v literaturi. Izbrali smo metodo, ki je opisana v monografiji za ubidekarenon kapsule v USP (United States Pharmacopeia) farmakopeji. Nato smo izvedli vrednotenje HPLC metode. Tako smo potrdili primernost kromatografskih pogojev za analizo koencima Q₁₀ in ugotovili, da metoda daje zanesljive ter ponovljive rezultate.

Preverili smo tudi učinkovitost ekstrakcije koencima Q₁₀ za pripravo vzorčnih raztopin. V ta namen smo na morebitno prisotnost zaostalega koencima Q₁₀ analizirali usedlino, ki ostane v bučki pri pripravi vzorcev, in ovojnice kapsul. Na osnovi rezultatov smo zaključili, da je ekstrakcija z izbrano zmesjo topil (n-heksan in brezvodni etanol v razmerju 5:2 (v/v)) ustrezna.

Z metodo HPLC smo analizirali različne vzorce kapsul z vsebnostjo 30 mg koencima Q₁₀, ki so dostopne na slovenskem tržišču. Rezultati kažejo, da je vsebnost celokupnega koencima Q₁₀ v vseh analiziranih vzorcih v intervalu od 27 do 33 mg. Po metodi, ki ne vključuje pretvorbe reducirane oblike koencima Q₁₀ v oksidirano obliko smo v analiziranih vzorcih ugotovili za ubidekarenon vrednosti, ki so nižje od vrednosti za celokupni koencim Q₁₀.

SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	adenozintrifosfat
CTD	skupni tehnični dokument (common technical document)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
FDA	Zvezna agencija za zdravila in hrano (Food and Drug administration)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Performance Liquid Chromatography)
JAZMP	Javna agencija RS za zdravila in medicinske pripomočke
LDL	lipoproteini nizke gostote (low density lipoprotein)
OSL	opažen varni odmerek (observed safe level)
PVD (RDA)	priporočen dnevni vnos (Recommended Daily Allowance)
VLDL	lipoproteini zelo nizke gostote (very low-density lipoprotein)
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril koencim A
ZIRS	Zdravstveni inšpektorat Republike Slovenije

1 UVOD

Koencim Q_{10} ali ubidekarenon je naravna snov, prisotna v vsaki živi celici telesa. Je izredno močan antioksidant. Nujno je potreben za optimalno delovanje vseh vrst celic.

Sodeluje v številnih procesih nastajanja energije znotraj celice - to energijo celice potrebujejo za življenje, oziroma za vse funkcije, ki jih opravljajo.

Največja koncentracija koencima Q_{10} je v srčni mišici, jetrih, ledvicah in vranici.

Koencim Q_{10} telo proizvaja samo, vendar z leti količina v telesu proizvedenega koencima Q_{10} hitro upada. Nekatera zdravila še dodatno zavirajo nastajanje koencima Q_{10} v telesu.

Koencim Q_{10} je v majhnih količinah prisoten tudi v hrani, večje količine pa vsebujejo prehranska dopolnila in zdravila. Indikacijsko področje za klinično rabo koencima Q_{10} je močno razširjeno. Dodajanje koencima Q_{10} nima nobenih znanih neželenih učinkov.

Na tržišču prisotni izdelki s koencimom Q_{10} v farmacevtskih oblikah imajo status prehranskih dopolnil in zdravil. Posamezno zakonodajno področje za zdravila in prehranska dopolnila urejajo različni predpisi.

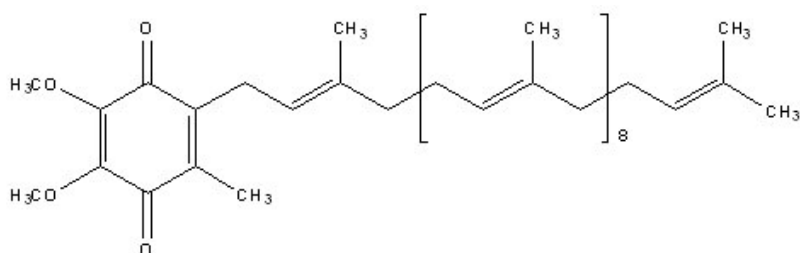
Zaradi pogoste uporabe tovrstnih izdelkov je preverjanje kakovosti še kako potrebno. Za določanje vsebnosti proučevane spojine potrebujemo občutljive in selektivne analize metode, ki so sposobne razlikovati med spojino in njej podobnimi molekulami, ki lahko nastanejo v procesu proizvodnje koencima Q_{10} .

2 UBIDEKARENON

Učinkovina z mednarodnim nelastniškim imenom ubidekarenon je bolj poznana pod imenom koencim Q₁₀. Uporabljajo se tudi drugi sinonimi, kot so ubikinon, koencim Q in vitamin Q. Ime ubikinon je sestavljeno iz ubi (ubikvitaren - povsod prisotni) in kinon, ki se nanaša na kemično sestavo snovi (1).

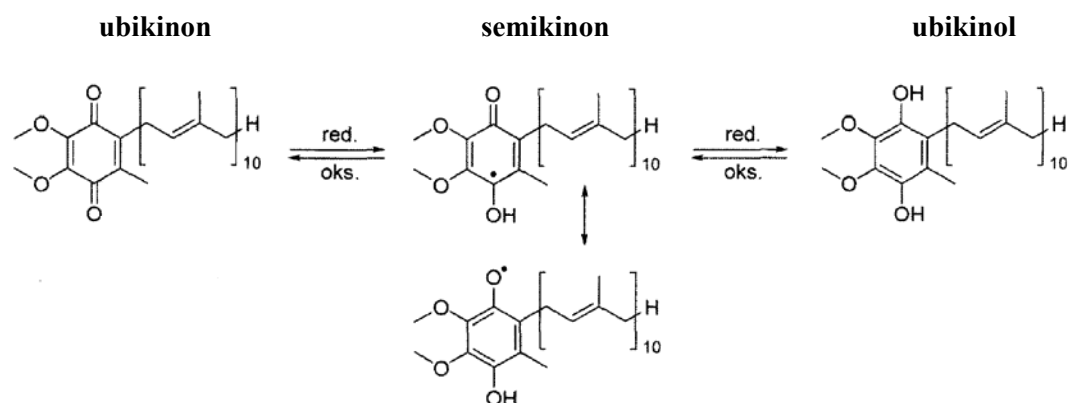
Kemijsko gre za 2,3-dimetoksi-5-metil-6-poliizoprenil-1,4-benzokinon, s stransko verigo desetih izoprenskih enot (2,3). Strukturna formula je predstavljena na sliki 1 (3). »All trans« oblika ubidekarena, ki je identična naravno prisotnemu koencimu Q₁₀ v živih bitjih, ima monografijo v Ph.Eur.

Ubidekarenon je rumena kristalinična snov s tališčem okrog 50 °C in relativno veliko molekulsko maso (Mr = 863) (3). Zaradi dolge nepolarne stranske verige ima molekula lipofilen značaj in je topna v maščobah (2,4).



Slika 1: Strukturna formula spojine koencim Q₁₀ (3)

Vse biološke funkcije koencima Q₁₀ temeljijo na njegovem redoks ravnotežju, saj relativno enostavno prehaja med kinonsko (oksidirano), semikinonsko in kinolno (reducirano) obliko. Prehajanje med posameznimi oblikami je predstavljeno na sliki 2 (4). Položaj redoks ravnotežja koencima Q₁₀ je v različnih delih telesa različen. V plazmi in ledvicah je ravnotežje pomaknjeno v smeri reducirane oblike, v možganih in pljučih pa se koencim Q₁₀ nahaja pretežno v oksidirani obliki (4).

Slika 2: Redoks stanje koencima Q₁₀ (4)

Ubikinon, komercialno najbolj dostopna oblika koencima Q₁₀, se v telesu pretvarja v reducirano obliko ubikinol, ki ima enake učinke na telo (4).

V človeškem telesu se koencim Q₁₀ večinoma nahaja v membranah mitohondrijev, medtem ko je v citosolu le okrog 10 % skupnega koencima Q₁₀. Koncentracije koencima Q₁₀ se v različnih delih telesa zelo razlikujejo; največ ga je v najbolj aktivnih organih (4). Tako je pri človeku največja koncentracija v srcu (110 μg/g tkiva) in najmanjša v pljučih (8 μg/g tkiva). V serumu ga je povprečno le 0,7 μg/ml (2).

Koencim Q₁₀ je prvi leta 1957 odkril in izoliral dr. Fred Crane s sodelavci Univerze v Wisconsinu iz mitohondrijev v govejem srcu. Njegovo kemijsko zgradbo je leta 1958 razkril dr. Karl Folkers s svojo skupino v Mercku. Bil je tudi prvi, ki je spojino pridobil v procesu fermentacije. Leta 1972 sta Littarru in Folkers dokazala pomanjkanje koencima Q₁₀ pri bolnikih s srčnimi boleznimi. Dr. Peter Mitchell pa je leta 1978 dobil Nobelovo nagrado za proučitev delovanja koencima Q₁₀ in njegove vloge v telesu. Pomen koencima Q₁₀ kot antioksidanta je podrobno proučil Lars Ernster (5).

2.1 DELOVANJE KOENCIMA Q₁₀

Ubikinon skrbi za nastanek 95 % celotne telesne energije in brez njega ni življenja. Brez ubikinona nobena celica ne more delovati. Mitohondriji so kot tovarne celice, ki proizvajajo adenozin trifosfat (ATP) - gorivo za vsako celico. Večji del proizvodnje molekul ATP

poteka v notranji membrani mitohondrijev, kjer se nahaja tudi koencim Q_{10} . Koencim Q_{10} je ključna komponenta, prenašalec elektronov in protonov v procesu oksidativne fosforilacije, verigi reakcij kjer nastaja ATP (5). Poleg tega, da spodbuja sintezo molekul ATP na notranji membrani mitohondrijev, koencim Q_{10} stabilizira celične membrane ter na ta način ohranja celovitost in delovanje celic (6).

Znano je dejstvo, da koencim Q_{10} v svoji reducirani obliki (ubikinol) deluje kot antioksidant. Za antioksidante je značilno, da radikalom oddajo lastne elektrone in jih tako nevtralizirajo in s tem zmanjšajo celične poškodbe. Ubikinol predstavlja več kot 90 % celotne vsebnosti koencima Q_{10} v človeški plazmi in je pomemben antioksidant v lipoproteinih v plazmi (5). Zavira oksidacijo proteinov in lipidov v celični membrani in preprečuje peroksidacijo lipidov, oksidacijske poškodbe deoksiribonukleinske kisline (DNA) in drugih molekul (2, 7). Za svojo antioksidacijsko aktivnost ne potrebuje vitamina E, lahko pa le tega regenerira iz njegove oksidirane oblike, tako kot vitamin C (7).

Koencim Q_{10} je pomemben tudi kot stabilizator celičnih membran, kar bistveno pripomore k temu, da ostanejo celice nedotaknjene in so sposobne normalno delovati. Dodatno igra pomembno vlogo pri prenosu protonov preko membrane lizosomov in tako ohranja optimalno vrednost pH v celicah. Lizosomi imajo pomembno vlogo pri prebavi odpadnih snovi in vsebujejo prebavne encime, ki lahko delujejo samo pri določeni vrednosti pH (1).

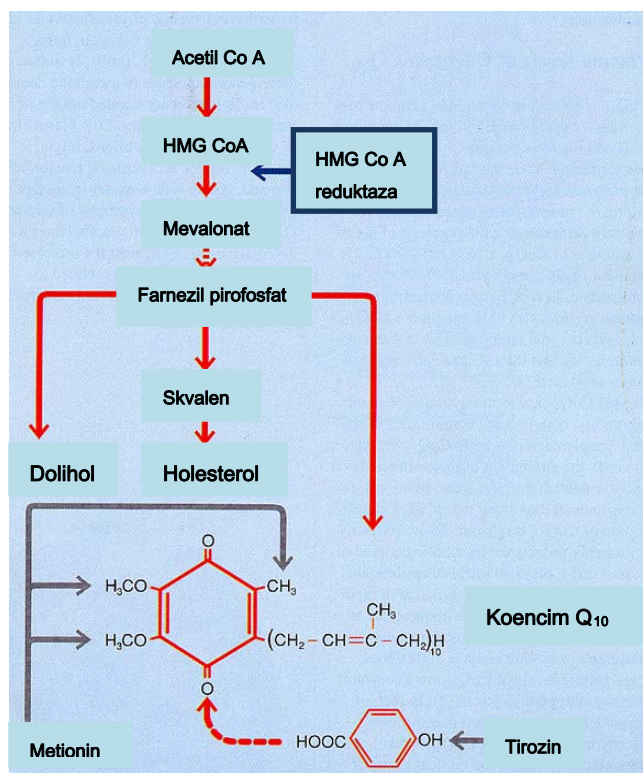
2.2 VIRI KOENCIMA Q_{10}

Koencim Q_{10} je prisoten v tkivih živali, rastlin in človeškem organizmu. Do določene mere ga telo lahko samo sintetizira, vendar pa sinteza koencima Q_{10} s starostjo upada. V telo ga je mogoče vnašati s hrano, ki je bogata s koencimom Q_{10} (npr. meso, ribe, olja, oreščki). Za vnos večjih količin pa so uporabnikom na voljo tudi prehranska dopolnila in zdravilo s koencimom Q_{10} .

BIOSINTEZA

Pri zdravih posameznikih je do določene mere mogoča biosinteza koencima Q_{10} , ki je večplastna. Iz tirozina ali fenilalanina poteka sinteza benzokinona. Hidrofobna izoprenska stranska veriga pa nastaja po dolgi poti iz acetil-koencima A preko mevalonatne poti (1, 2).

Encimi, ki sodelujejo v sintezi izoprenske stranske verige koencima Q₁₀ so: HMG-CoA reduktaza, farnezil sintaza in trans-prenil transferaza (7). Izoprenskih enot v stranski verigi humanega koencima je deset. Njihovo število je odvisno od živalske vrste in je od šest do deset (človek 10, podgana 9, glive 7, kvasovke 6). V zadnji stopnji sinteze pride do združenja benzokinona in izoprenske stranske verige. Slika 3 predstavlja prikaz biosinteze koencima Q₁₀ (8).



Slika 3: Prikaz biosinteze koencima Q₁₀ (8)

VNOS S HRANO

S starostjo endogena sinteza upada in postaja pomembnejši eksogeni vnos. S hrano zaužijemo v povprečju 3 do 5 mg koencima Q₁₀, ki je prisoten v številnih vrstah hrane (1). Vsebnosti koencima Q₁₀ v nekaterih živilih so predstavljene v tabeli I. Veliko koencima Q₁₀ vsebuje meso (sardine do 64 mg/kg in rdeče meso do 40 mg/kg), precej pa ga vsebujejo tudi oreščki (arašidi do 27 mg/kg). Mnogo manj ga je v mleku in mlečnih izdelkih, še zlasti v tistih, ki so pripravljene s posnetim mlekom. Vsebnost koencima Q₁₀ v sadju in zelenjavi je pod 5 mg/kg. S predelavo živil se vsebnost manjša še zlasti z odstranjevanjem maščob, v katerih se koencim Q₁₀ raztaplja (4,9).

Potrebam po koencimu Q₁₀ ni mogoče zadostiti z običajnim načinom prehranjevanja, še zlasti ne s hrano, ki vsebuje malo maščob. Tudi na slovenskem tržišču so že prisotna živila obogatena s koencimom Q₁₀ (mleko, jogurt, kefir). Na ta način lahko v telo dodatno vnašamo koencim Q₁₀.

Tabela I: Vsebnost koencima Q₁₀ v nekaterih živilih (9)

Hrana	Koncentracija koencima Q₁₀ [mg/kg]
<u>Meso</u>	
- Govedina	16-40
- svinjina	13-45
- perutnina	8-25
<u>Ribe</u>	
- sardine	5-64
- skuša (rdeče meso)	43-67
- skuša (belo meso)	11-16
<u>Olja</u>	
- koruzno (Italija)	106-139
- olivno (Italija)	109-160
- sončnično (Italija)	10-15
<u>Oreški</u>	
- arašidi	27
- orehi	19
- mandlji	5-14
<u>Zelenjava</u>	
- peteršilj	8-26
- brokoli	6-9
- cvetača	2-7
<u>Sadje</u>	
- avokado	10
- črni ribez	3
- jagode	1

VNOS S PREHRANSKIMI DOPOLNILI ALI ZDRAVILI

Pri ljudeh, ki sintetizirajo manjše količine koencima Q₁₀, dodaten vnos s hrano ne zadostuje za doseganje pozitivnih učinkov koencima Q₁₀, ki so opisani v nadaljevanju. V teh primerih je potreben dodaten vnos večjih količin koencima Q₁₀. S prehranskimi dopolnili ali zdravili, v različnih farmacevtskih oblikah, lahko v telo vnesemo precej velike količine koencima Q₁₀.

Najpogostejša farmacevtska oblika so mehke kapsule z ubidekarenonom v oljni suspenziji. V obliki tablet, šumečih tablet in sirupa so na voljo tudi izdelki s kristaliničnim koencimom Q₁₀ in proizvodi s solubilizirano obliko koencima Q₁₀ v kompleksu s ciklodekstrinom. Dodatno so v obliki mehkih kapsul dostopni še izdelki z oljno suspenzijo ubikinola. Izdelki vsebujejo od 3 do 50 mg koencima Q₁₀ v eni kapsuli, tableti ali enem mililitru sirupa. Tako kot na svetovnih tržiščih ima tudi pri nas večina izdelkov s koencimom Q₁₀ status prehranskega dopolnila. Na slovenskem tržišču je trenutno prisotno le eno zdravilo s koencimom Q₁₀, ki je brez recepta uporabnikom na voljo v lekarnah in specializiranih prodajalnah.

Koencim Q₁₀, ki se uporablja v proizvodnji obogatitih živil, prehranskih dopolnil in zdravil je lahko pridobljen na dva načina: proces vrenje s kvasovkami ali kemična sinteza.

Pri postopku vrenja s kvasovkami je nastali koencim Q₁₀ v obliki trans izomera in je popolnoma enak tistemu, ki je naravno prisoten v mesu, ribah ter drugih izdelkih. Varnost koencima Q₁₀, pridobljenega z vrenjem s kvasovkami, potrjujejo različne raziskave. Kljub temu, da so nekateri postopki pridobivanja patentirani, niso vsi opisi dostopni. Nekateri koraki pridobivanja spojine imajo status poslovna skrivnost.

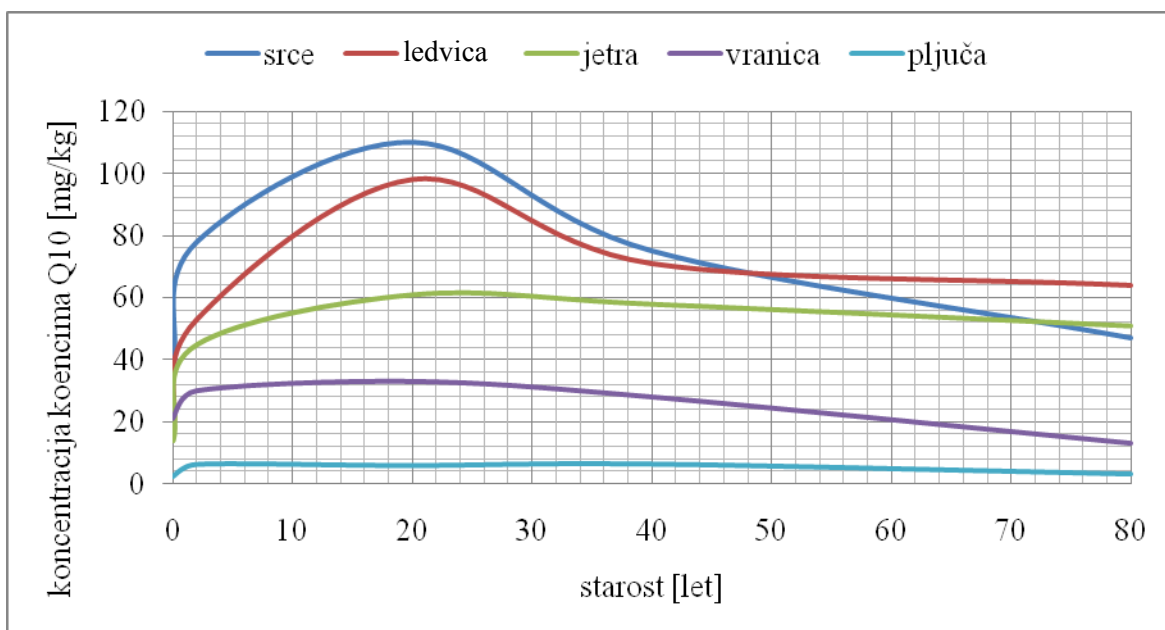
Pri postopku kemične sinteze pa nastane tudi cis-izomer, molekularna oblika, ki ni enaka naravno prisotnemu koencimu Q₁₀.

V postopku pridobivanja koencima Q₁₀ lahko nastanejo tudi druge spojine: 2,3-dimetoksi-5-metilbenzen-1,4-diol, ubikinon-9, ubikinon-8, ubikinon-7, ubikromenol ter cis-izomer ubidekarena in so navedene v poglavju nečistote v monografiji ubidekarena (3).

2.3 VZROKI ZA POMANJKANJE

V človeškem telesu je skupaj 2 g koencima Q₁₀. Telo ga dnevno nadomesti okrog 0,5 g predvsem z endogeno sintezo, deloma pa s hrano. Pomanjkanje koencima Q₁₀ v telesu je lahko posledica motnje v biosintezi, pomanjkljivega vnosa s hrano ali prevelike porabe (4). Človek ima največ koencima Q₁₀ pri 20. letu, nato pa čedalje manj, ker učinkovitost sinteze s staranjem pada (2,4). Koncentracija v srcu se od 20. do 80. leta zniža za skoraj 60-odstotkov na 47 µg/g tkiva. Tudi v vranici se v enakem obdobju koncentracija zmanjša za 60 %, medtem ko je zmanjšanje v ledvicah in jetrih manjše (35 oziroma 17 %). Na sliki 4 je prikazano spreminjanje koncentracije koencima Q₁₀ v srcu, ledvicah, jetrih,

vranici in pljučih v odvisnosti od starosti. Endogena sinteza je lahko zmanjšana tudi pri rednih uživalcih inhibitorjev HMG-CoA reduktaze – statinov (zdravil, ki se uporabljajo v terapiji bolnikov s hiperlipidemijo). Statini kompetitivno inhibirajo tvorbo mevalonata, ki je prekursor pri biosintezi holesterola in koencima Q₁₀ (8). Pomanjkanje so opazili tudi pri različnih bolezenskih stanjih, pri ljudeh z neuravnoteženo prehrano in kadilcih (4).



Slika 4: Starostno povezane spremembe koncentracije koencima Q₁₀ v nekaterih človeških organih (7)

2.4 ABSORPCIJA IN PRESNOVA

Koencim Q₁₀ se slabo absorbira iz prebavnega trakta, ker je zaradi svoje kemijske zgradbe netopen v vodi. Učinkovitost absorpcije je odvisna od več dejavnikov, tudi od načina zaužitja in odmerka koencima Q₁₀. Absorpcijo lahko povečamo s hkratnim uživanjem hrane in z delitvijo enega večjega na več manjših odmerkov koencima Q₁₀ tekom dneva (4). Z večanjem odmerka zaužitega koencima Q₁₀ se postopoma znižuje učinkovitost njegove absorpcije iz črevesja. Nekatere študije nakazujejo, da imajo vodotopne oblike koencima Q₁₀ (npr. v kompleksu s ciklodekstrinom) boljše biološko uporabnost, kar pomeni, da je njihova absorpcija iz črevesja večja in posledično raven koencima Q₁₀ v plazmi višja. (1,4).

Mehanizem absorpcije iz tankega črevesja in prenosa koencima Q_{10} v krvni obtok je slabo raziskan vendar sklepajo, da je zelo podoben kot pri vitaminu E. Sama absorpcija temelji predvsem na emulgiranju s pomočjo žolčnih kislin v tankem črevesju. Zaužiti ubikinon se po absorpciji v telesu spontano reducira. Zato se koencim Q_{10} v plazmi pojavi pretežno v reducirani obliki (4).

Absorpcija iz črevesja doseže prvi vrh v približno 6 urah, drugi vrh pa po 24 urah, verjetno zaradi enterohepatične cirkulacije. Razpolovni čas v plazmi je približno 34 ur. Iz črevesja se eksogeni koencim Q_{10} absorbira v jetra, kjer se ga okoli 30 % veže na lipoproteine majhne in zelo majhne gostote (LDL in VLDL). Z njimi potuje v tkiva – koncentrira se predvsem v srcu, ledvicah in jetrih. Razpolovni čas v tkivih je med 50 in 125 urami. Izločanje iz jeter se konča v okoli 8 urah. Okrog 60-odstotkov peroralnega odmerka koencima Q_{10} se nespremenjenega preko žolča izloči v fecesu, le majhen del (8 %) se ga v 48 urah izloči z urinom (10).

Dnevne koncentracije koencima Q_{10} v plazmi se gibljejo med 0,30 in 3,84 $\mu\text{g/ml}$, najpogosteje so med 0,7 in 1 $\mu\text{g/ml}$. Pri zdravih osebah je plazemska koncentracija koencima Q_{10} odvisna od spola (pri moških je večja kakor pri ženskah), koncentracije holesterola in trigliceridov v plazmi (plazemski lipoproteini so prenašalci koencima Q_{10} v krvi) ter starosti (10).

2.5 VPLIV KOENCIMA Q_{10} PRI RAZLIČNIH BOLEZNIH

Koencim Q_{10} je učinkovit, ko doseže trikratno normalno plazemsko koncentracijo. Višja koncentracija koencima Q_{10} v plazmi je potrebna zato, ker le na tak način lahko dosežemo višjo koncentracijo koencima Q_{10} v možganih in perifernih tkivih (1). Iz tega vzroka je potrebno odmerjati zadostne količine koencima Q_{10} (11). Koencim Q_{10} je bil preizkušen v različnih raziskavah na živalih in ljudeh in se je v nekaterih primerih izkazal kot učinkovito sredstvo za preprečevanje in/ali zdravljenje več bolezni, ki so predstavljene v nadaljevanju. Priporočeni odmerek koencima Q_{10} , ki naj bi ga zaužila odrasla oseba kot dodatek k prehrani, se glede na različne raziskave giblje od 30 do 100 mg/dan. Terapevtski odmerki koencima Q_{10} se gibljejo od 100 do 300 mg/dan; pri zdravljenju Parkinsonove bolezni pa so uporabili tudi zelo visoke odmerke do 3000 mg/dan pod zdravniškim nadzorom (1,11,12).

Najbolj raziskan je vpliv dodanega koencima Q₁₀ na srčno-žilne bolezni. Vse več raziskujejo tudi njegov vpliv na nevrodegenerativne bolezni. Študije uporabe koencima Q₁₀ posegajo tudi na številna druga področja. Še posebno obolenja pri katerih so zaznali znižane plazemske koncentracije koencima Q₁₀ kot so mitohondrijske bolezni, migrena, HIV/AIDS in neplodnost.

Avtorji navajajo, da bo v prihodnosti potrebno opraviti še več dobro načrtovanih raziskav, na večjem številu bolnikov preden bo z gotovostjo možno trditi, da koencim Q₁₀ preprečuje in/ali zdravi določene bolezni.

BOLEZNI SRCA

Večja koncentracija koencima Q₁₀ v srcu v primerjavi z ostalimi organi je pokazatelj njegove velike aktivnosti v tem organu. Od leta 1970 je znano, da imajo bolniki s srčno boleznijo zmanjšane koncentracije koencima Q₁₀ v serumu in srčni mišici. Japonci so leta 1974 prvi na svetu bolnikom z boleznimi srca začeli dodajati koencim Q₁₀. Ker se je izkazal za uspešnega se sedaj redno uporablja v različne klinične namene (2,11).

Dodajanje koencima Q₁₀ v času pred in po operaciji srca izboljša pooperacijsko delovanje srca in tako skrajša čas okrevanja ter zmanjša število zapletov (1,11).

Meta analiza uporabe koencima Q₁₀ (60–200 mg/dan) v randomiziranih kliničnih preizkusih pri posameznikih, ki trpijo za srčnim popuščanjem, je pokazala precejšnje in klinično pomembno izboljšanje pri številnih parametrih delovanja srca (13). Splošen pregled uporabe koencima Q₁₀ pri posameznikih s kroničnim srčnim popuščanjem (odmerki 50 do 200 mg/dan v obdobju 1–12 mesecev) je pokazal, da bi morali tovrstnim pacientom priporočati dodaten vnos koencima Q₁₀ (14).

Baggio s sodelavci je leta 1993 napravil veliko raziskavo učinkovitosti koencima Q₁₀ kot dodatnega zdravila, pri odpovedovanju srca. Sodelovalo je 2500 bolnikov, ki so tri mesece prejeli povprečno 100 mg koencima Q₁₀ na dan. Različni klinični simptomi so se izboljšali za 50 do 80 %, neželene učinke pa so zabeležili le pri petih bolnikih (15).

Raziskave so pokazale, da je koencim Q₁₀ učinkovit tudi kot podporno zdravljenje angine pectoris saj izboljša toleranco za napor. V nekaterih primerih je prišlo do statistično pomembnega znižanja pogostosti simptomov angine pectoris ter posledično do znižane porabe nitroglicerina (1).

Krvni tlak je dobro poznan biološki kazalec zdravja srca. Meta-analiza 12 kliničnih raziskav o vplivu dodanega koencima Q₁₀ na povišan krvni pritisk je pokazala, da je

koencim Q₁₀ učinkovit pri znižanju sistoličnega krvnega pritiska do 17 mm Hg in diastoličnega krvnega pritiska do 10 mm živega srebra (16). Na ta način bi lahko pri nekaterih bolnikih zmanjšali odmerke antihipertenzivov ali celo prekinili uporabo le-teh (1,6,12).

ATEROSKLEROZA

Ateroskleroza je še vedno ne povsem pojasnjen kronični proces, ki se odvija v steni žil odvodnic oziroma arterij. Tesno je povezan z boleznimi srca in ožilja. Ugotovili so, da reducirana oblika koencima Q₁₀ preko redukcije vitamina E zveča odpornost LDL in tako zavira njegovo oksidacijo. Na ta način je zavrt vstop oksidiranega holesterola LDL v žilno steno (1,2). Pri zaviranju nastanka ateroskleroze je bilo učinkovitejše hkratno dodajanje koencima Q₁₀ in vitamina E kot pa dodajanje le ene ali druge snovi (1,2,17).

MIGRENA

Uživanje koencima Q₁₀ pomaga pri preprečevanju migrenskih glavobolov. Pri odraslih zmanjšuje pogostost glavobolov in povprečno število dni z glavobolom ter povezane slabosti. Prav tako zmanjša pogostost migrenskih glavobolov pri otrocih z nizko plazemsko koncentracijo koencima Q₁₀ (1,11,12).

PARKINSONOVA BOLEZEN

Parkinsonova bolezen je napredujoča bolezen živčevja, ki prizadene predvsem telesno gibanje (motoriko). Osnovni razlog za razvoj bolezni je degeneracija živčnih celic v bazalnih ganglijih in s tem zmanjšana koncentracija dopamina. Domnevajo, da igra pri nastanku te bolezni pomembno vlogo motnja v delovanju mitohondrijev v bazalnih ganglijih (v substantii nigri). Shults je s sodelavci opravil 16 mesečno randomizirano, dvojno slepo, s placebom kontrolirano študijo na 80 bolnikih z začetno Parkinsonovo boleznijo. Raziskovali so učinkovitost dodajanja koencima Q₁₀ v odmerkih 300 do 1200 mg na dan. V skupini, ki je jemala koencim Q₁₀ v najvišjem odmerku, so zabeležili statistično pomembno upočasnitev napredovanja bolezni (18). Avtorji navajajo, da so za potrditev omenjenega učinka potrebne nadaljnje raziskave (1,11).

HUNTINGTONOVA BOLEZEN

Huntingtonova bolezen je napredujoča, dedna bolezen, katere vzrok je mutacija na enem od alelov gena za protein huntingin. Pri bolnikih z začetno obliko Huntingtonove bolezni, ki so jim 30 mesecev v dvojno slepi, s placebom kontrolirani študiji dodajali koencim Q₁₀ v odmerku 600 mg na dan, so po letu dni zdravljenja opazili pozitiven učinek na kognitivne sposobnosti in nekoliko upočasnjjen potek bolezni (19). Leta 2004 je FDA ubikinol, reducirano obliko koencima Q₁₀, uvrstila v seznam zdravil sirot za zdravljenje Huntingtonove bolezni (12). Za zmanjšanje bolezenskih znakov in upočasnitev bolezni je potrebno zaužiti več kot 600 mg koencima Q₁₀ na dan (1,11,12,19).

HIV/AIDS

Pri bolnikih, okuženih z virusom HIV, je raven koencima Q₁₀ v telesu znižana. Predpostavljajo, da koencim Q₁₀ izboljša delovanje imunskega sistema pri pacientih okuženih z virusom HIV in obolelih z AIDS-om. Ker iz dosedanjih raziskav ni jasno razvidno, da bi dodatno zdravljenje s koencimom Q₁₀ imelo pomembnejše koristne učinke, avtorji navajajo, da so za potrditev ugodnega vpliva potrebne dodatne raziskave (1,11).

PRIMARNE MITOHONDRIJSKE BOLEZNI

V to skupino uvrščamo bolezni, pri katerih gre za prirojeno okvaro oksidativne fosforilacije v mitohondrijih. Mitohondrijske bolezni še najbolj prizadenejo mišice in živčevje, saj so celice omenjenih tkiv najbolj odvisne od nemotene oskrbe z energijo. Primer take bolezni je mitohondrijska mišična slabost (mitohondrijska miopatija). Pri zdravljenju s koencimom Q₁₀ pomembno poraste sinteza ATP v limfocitih bolnikov z motnjo oksidativne fosforilacije in zato domnevajo, da koencim Q₁₀ pozitivno učinkuje pri zdravljenju bolnikov s tovrstno motnjo. FDA je farmacevtsko obliko s koencimom Q₁₀ (UbiQGel) uvrstila v seznam zdravil sirot za zdravljenje mitohondrijskih encefalopatij (1, 11,12).

SLADKORNA BOLEZEN

Pri bolnikih s sladkorno boleznijo so našli nižje vrednosti reduciranega koencima Q₁₀ v plazmi v primerjavi z zdravimi ljudmi. Dodatek koencima Q₁₀ je priporočljiv pri bolnikih, ki uživajo peroralne hipoglikemike, saj nekateri od njih zmanjšujejo endogeno vsebnost

koencima Q₁₀. Dodatek izboljša glikemično stanje pri diabetikih in zato je potrebno prilagoditi odmerke hipoglikemika. Avtorji ugotavljajo, da so v prihodnosti potrebne dodatne dobro načrtovane raziskave (1,11,12).

VNETJE OBZOBNIH TKIV – PERIODONTITIS

Manjše raziskave so pokazale, da zaužitje in celo lokalno dajanje koencima Q₁₀ lahko koristno vplivata na zdravljenje periodontitisa. Obstajajo poročila o zmanjšanju bolečine, krvavitvev in otekanja dlesni. Kot navajajo avtorji so potrebna nadaljnja preučevanja, saj so bile raziskave majhne in slabo zasnovane (1, 11, 12).

RAK IN KEMOTERAPIJA Z ANTRACIKLINI

Glavni neželeni učinek antraciklina doksorubicina, ki se uporablja za zdravljenje določenih oblik raka, je kardiomiopatija. Nastane nepovratna okvara miokardnih mitohondrijev. Menijo, da koencim Q₁₀ zavaruje srce, ne da bi zmanjšal učinek kemoterapevtika. Raziskave kažejo, da so zaščitni učinki koencima Q₁₀ na srcu v povezavi z antraciklinskim zdravljenjem onkoloških bolnikov ugodni, vendar pa so potrebne dodatne obsežnejše raziskave (1,11).

Višje odmerke koencima Q₁₀ nekateri priporočajo bolnikom, ki bodo začeli z zdravljenjem rakavega obolenja, predvsem zaradi domnevno izboljšane tolerance na kemoterapijo, vendar pa so tudi v tem primeru za potrditev potrebne dodatne raziskave (1).

NEPLODNOST MOŠKIH

Pri neplodnih moških so ugotovili zmanjšane koncentracije koencima Q₁₀ v seminalni plazmi in semenčicah. Šest mesečna študija je pokazale, da dodajanje 200 mg koencima Q₁₀ na dan zveča njegovo koncentracijo v seminalni plazmi in spermijih ter tudi okrepi gibljivost semenčic (10,11,20).

STATINSKA MIOPATIJA

Inhibitorji HMG-CoA reduktaze oziroma statini so zdravila, ki zavirajo delovanje encima HMG-CoA reduktaze in jih uporabljajo v terapiji bolnikov s hiperlipidemijo. Omenjeni encim je pomemben pri sintezi holesterola, hkrati pa tudi bistveni encim pri sintezi

koencima Q₁₀. Inhibitorji HMG-CoA reduktaze blokirajo sintezo obeh, holesterola in endogenega koencima Q₁₀. Pri terapiji s statini pogosto prihaja do miopatij. Pomembno vlogo pri nastanku le teh utegne igrati pomanjkanje koencima Q₁₀ zaradi zaviranja obeh sinteznih poti. To bi lahko preprečili z dodajanjem eksogenega koencima Q₁₀, ki se v terapevtski učinek statinov ne vplete (21). Znižanje plazemske koncentracije koencima Q₁₀ predvsem pri srčnih bolnikih bi bilo lahko klinično zelo pomembno. Zato avtorji navajajo, da je smiselno razmisliti o dodajanju 30 do 250 mg koencima Q₁₀ na dan srčnim bolnikom, ki se zdravijo s statini (1,11,12).

Nekateri ameriški proizvajalci prehranskih dopolnil s koencimom Q₁₀ na zunanji ovojnini že navajajo priporočilo za sočasno uporabo koencima Q₁₀ s statini, saj bi s tem lahko preprečili s statini povzročeno miopatijo. FDA tovrstne navedbe ni potrdila ampak so dodane na pobudo proizvajalca.

2.6 VARNOST UPORABE KOENCIMA Q₁₀

Po več kot 30-letni uporabi koencima Q₁₀ pri ljudeh in po številnih kliničnih raziskavah niso bili zabeleženi resnejši neželeni učinki. Zelo redko se pri uživanju koencima Q₁₀ pojavijo simptomi v prebavilih kot so slabost, driska, zmanjšanje teka, bruhanje in občutki nelagodja v trebuhu. Omenjene učinke se da omiliti tako, da se odmerki, višji od 100 mg, razdelijo na dva ali tri manjše dnevne odmerke. V nobeni izmed številnih študij varnosti koencima Q₁₀, tako pri poskusih na živalih kot tudi na ljudeh ni bilo poročil o pomembnih neželenih učinkih ali toksičnosti koencima Q₁₀ (1,6,22).

V študijah na živalih so pri testih toksičnosti po enkratnem odmerku določili najvišji odmerek, pri katerem niso opazili neželenih učinkov pri 5000 mg/kg. Pri 4 in 52-tedenskih testih subakutne in kronične toksičnosti so ga lahko določili pri 1200 mg/kg telesne mase. Pri tem niso opazili sprememb v vedenju ali prehranjevanju živali niti sprememb v zgradbi ali delovanju organov. Koencim Q₁₀ ni pokazal genotoksičnega potenciala, prav tako ne lokalne toksičnosti ali teratogenih učinkov. Vse študije na živalih so bile dobro načrtovane in kontrolirane, izvedene na obeh spolih več živalskih vrst (6,22).

Ugotovljeno je bilo, da je odmerek koencima Q₁₀ do 1200 mg/dan varen odmerek, pri katerem niso opazili pomembnih neželenih učinkov. Tako je 1200 mg koencima Q₁₀ na dan določen kot varni odmerek (OSL) (1,6,22).

V nekaterih manjših raziskavah so pacienti uživali 2400 do 3000 mg koencima Q₁₀ na dan. Raziskave so bile slabše načrtovane in zato so za potrditev odsotnosti neželenih učinkov ob tako visokih odmerkih potrebne dodatne raziskave (22).

INTERAKCIJE Z ZDRAVILI

Ker je koencim Q₁₀ strukturno soroden vitaminu K, so možne interakcije koencima Q₁₀ in varfarina (antikoagulant, ki preprečuje od vitamina K odvisno sintezo faktorjev strjevanja krvi). O tem obstajajo dokazi *in vitro*. Vpliva koencima Q₁₀ na spremembo protrombinskega časa pri poskusih na živalih niso zanesljivo dokazali. O možni interakciji z varfarinom obstaja le nekaj poročil, ki se nanašajo na posamezne primere bolnikov. Randomizirana, dvojno slepa, s placebom kontrolirana študija ni potrdila vpliva koencima Q₁₀ na mednarodno umerjeno razmerje časov strjevanja krvi (INR) bolnikov (23). Znanstveniki navajajo, da bo potrebno v prihodnosti izvesti dodatne raziskave, ki bodo interakcijo koencima Q₁₀ in varfarina potrdile ali ovrgle. Pacientom na antikoagulantni terapiji z varfarinom svetujejo naj se izogibajo tej kombinaciji zdravil, v primeru sočasne terapije s koencimom Q₁₀ pa morajo redno nadzorovati INR (1,10). V literaturi ni opisanih drugih interakcij koencima Q₁₀ z zdravili.

3 ZAKONODAJA PREHRANSKIH DOPOLNIL IN ZDRAVIL

Izdelki s koencimom Q₁₀ prisotni na Slovenskem tržišču imajo večinoma status prehranskega dopolnila. Eden izmed izdelkov je pri JAZMP pridobil dovoljenje za promet z zdravilom in je brez recepta na voljo v lekarnah in specializiranih prodajalnah. Povprečen uporabnik le s težavo loči med prehranskimi dopolnili in zdravili. Prehranska dopolnila so prav tako kot zdravila na voljo v lekarnah in to v ovojnini, ki jih niti ne ločijo od zdravil.

Kot navajata Zakon o zdravilih (24) in Pravilnik o prehranskih dopolnilih (25) so pripravki v obliki tablet, kapsul, sirupov, praškov itd. lahko na trgu kot zdravila ali prehranska dopolnila. Za razvrstitev teh izdelkov je poleg sestave odločilna namembnost izdelka ter pripisovanje zdravilnih učinkov.

Mnogim podjetnikom so zahtevna farmacevtska tehnologija, preverjanje in dokazovanje kakovosti farmacevtskih izdelkov v skladu z dobrimi proizvodnimi praksami ter nadzorovano in omejeno trženjem zdravil ovira, ki se ji skušajo izogniti prav z razvrščanjem svojih proizvodov med prehranska dopolnila.

Kljub navidezni podobnosti je razlika med zdravili in prehranskimi dopolnili velika. Zdravila pred prihodom na trg pridobijo dovoljenje za promet in imajo preverjeno kakovost, dokazano varnost ter učinkovitost. Namenjena so zdravljenju, preprečevanju in diagnosticiranju bolezni. Izdelana so v skladu s strogimi predpisi dobre proizvodne prakse (GMP), ki je pod ustreznim inšpekcijskim nadzorom. Vse informacije o učinkovitosti, opozorilih, previdnostnih ukrepih, kontraindikacijah, neželenih učinkih zdravil so verodostojne. Namen prehranskih dopolnil pa je le dopolnjevati običajno prehrano. So koncentrirani vir prehransko in fiziološko pomembnih sestavin. Njihova kakovost in učinkovitost nista preverjeni. Uporabnik mora v tem primeru zaupati proizvajalcu. Njihova proizvodnja naj bi potekala po postopku, ki temelji na načelih analize tveganj in kritičnih nadzornih točk (HACCP). Informacije o prehranskih dopolnilih niso preverjene in v mnogih primerih zavajajo uporabnike.

V Evropski skupnosti se je na tržišču pojavljalo vse več prehranskih dopolnil. Zakonodajno področje je bilo v vsaki državi članici Evropske unije urejeno z različnimi nacionalnimi predpisi. Zaradi različnih predpisov je prihajalo do težav pri prostem pretoku prehranskih dopolnil med državami, ustvarjali so neenake konkurenčne pogoje ter tako neposredno vplivali na delovanje notranjega trga. Zato je Evropski parlament in svet junija 2002 sprejel direktivo 2002/46/ES o približevanju zakonodaj držav članic o prehranskih dopolnilih (26). Države Evropske unije so morale direktivo prenesti v svojo zakonodajo in tako je Republika Slovenija v Uradnem listu leta 2003 objavila Pravilnik o prehranskih dopolnilih, ki določa pogoje, katere morajo izpolnjevati prehranska dopolnila (25) in je glavna zakonska osnova na področju prehranskih dopolnil. Ker prehranska dopolnila spadajo v skupino predpakiranih živil je za pripravo njihovih označb potrebno upoštevati tudi zahteve Pravilnika o splošnem označevanju predpakiranih živil (27). Navedbe prehranskih in zdravstvenih trditev na prehranskih dopolnilih morajo ustrezati zahtevam uredbe ES št. 1924/2006 evropskega parlamenta in Sveta o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih (28). Prehranska dopolnila, ki vsebujejo rastline in rastlinske izvlečke morajo biti v skladu s Pravilnikom o zdravilnih rastlinah (29).

Zakonska osnova za zdravila je Zakon o zdravilih (24). Ta je usklajen z evropskimi uredbami in direktivami, ki se nanašajo na zdravila ali pa so v njihovi tesni povezavi. Zakon opisuje samo glavne zahteve za naslednja področja: dovoljenje za promet, preskušanje zdravil, dovoljenje za izdelavo, označevanje in navodilo za uporabo, promet z zdravili, farmakovigilanca, oglaševanje, uradna kontrola kakovosti in pristojbine. Za vsako izmed navedenih področij je na voljo podrejeni predpis – pravilnik.

3.1 PREHRANSKA DOPOLNILA

V pravilniku so prehranska dopolnila definirana kot izdelki, ki vsebujejo prehransko in fiziološko pomembne sestavine živil v koncentrirani obliki. Pripravljena so lahko v različnih farmacevtskih oblikah tako, da jih je mogoče uživati v odmerjenih majhnih količinskih enotah (25).

SUROVINE ZA PROIZVODNJO PREHRANSKIH DOPOLNIL

Skladno s pravilnikom se kot "hranila" v prehranskih dopolnilih uporabljajo vitamini in minerali. Izdelki lahko vsebujejo tudi aminokislino, maščobne kisline, vlaknine, rastline in rastlinske izvlečke, mikroorganizme ter druge snovi s hranilnim ali fiziološkim učinkom. Vse seveda samo pod pogojem, da je njihova varnost v prehrani ljudi znanstveno utemeljena. Na nivoju Evropske unije so določeni vitamini in minerali ter njihove kemijske oblike, ki jih je dovoljeno uporabljati za proizvodnjo prehranskih dopolnil (25).

Pravilnik navaja, da morajo vitaminske in mineralne snovi izpolnjevati predpisane pogoje čistosti, v skladu s predpisi o čistosti aditivov, oziroma čistote v skladu z Evropsko farmakopejo in drugimi predpisi, ki urejajo čistost oziroma čistote snovi (25).

V prehranskih dopolnilih je praviloma dovoljeno uporabljati tudi zdravilne rastline razvrščene v kategorijo H. Uporaba je dovoljena pod pogojem, da se izdelkom ne pripisuje zdravilnih učinkov v smislu preprečevanja, zdravljenja ali ozdravljenja bolezni pri ljudeh (29). V proizvodnji prehranskih dopolnil je dovoljeno uporabljati tudi koencim Q₁₀ (30).

OZNAČEVANJE PREHRANSKIH DOPOLNIL

Nekaj zahtev glede označevanja prehranskih dopolnil navaja pravilnik o prehranskih dopolnilih (25). Označba mora vsebovati naslednje podatke:

- navedba »prehransko dopolnilo« ob imenu izdelka;
- imena vrste hranil ali snovi, ki so značilne za prehransko dopolnilo ali podatek o naravi hranil ali snovi;
- priporočeno dnevno količino oziroma odmerek prehranskega dopolnila;
- opozorilo: "Priporočene dnevne količine oziroma odmerka se ne sme prekoračiti.";
- navedbo: "Prehransko dopolnilo ni nadomestilo za uravnoteženo in raznovrstno prehrano";
- opozorilo: "Shranjevati nedosegljivo otrokom!".

Potrebno je označiti količino posameznega hranila ali snovi s hranilnim ali fiziološkim učinkom. Količino posameznih vitaminov in mineralov je potrebno izraziti kot odstotek priporočenega dnevnega vnosa (PDV/ RDA), ki se lahko prikaže tudi v grafični obliki (25).

Prehranska dopolnila morajo biti označena tudi skladno s Pravilnikom o splošnem označevanju predpakiranih živil (27). Označbe morajo biti v slovenskem jeziku, na opaznem mestu embalaže tako, da so zlahka vidne, razumljive, nedvoumne, jasne, čitljive in neizbrisne. Označbe ne smejo zavajati končnega potrošnika zlasti glede lastnosti, izvora, sestave in količine. Prepovedano je pripisovati zdravilne lastnosti v smislu preprečevanja, zdravljenja ali ozdravljenja bolezni ljudi (27).

Na trgu je vedno večje število živil, ki so bila označena in oglaševana s prehranskimi in zdravstvenimi trditvami. Da bi preprečili zavajanje potrošnikov in zagotovili visoko raven varstva potrošnikov, je EU na tem področju sprejela enotno zakonodajo. Uporabo prehranskih in zdravstvenih trditev na živilih ureja Uredba (ES) št. 1924/2006 Evropskega Parlamenta in Sveta evropske unije o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih (28). Uporablja se za prehranske in zdravstvene trditve pri označevanju, predstavljanju ali oglaševanju živil. »Trditev« pomeni vsako sporočilo ali predstavitev, ki ni obvezna v okviru zakonodaje, vključno s slikovno, grafično predstavitevjo ali predstavitevjo s simboli, s katero se navaja ali namiguje, da ima živilo posebne lastnosti. »Prehranska trditev« pomeni vsako trditev, ki navaja, domneva ali namiguje, da ima živilo posebno ugodne prehranske lastnosti zaradi energije (kalorične vrednosti) in/ali hranil ali drugih snovi. »Zdravstvena trditev« pa pomeni vsako trditev, ki navaja, domneva ali namiguje, da obstaja povezava med kategorijo živil, živilom ali eno od njegovih sestavin na eni strani in zdravjem na drugi strani (npr. pomaga pri prebavi) (28).

Na pristojne nacionalne organe, ki so bili določeni za sprejemanje predlogov zdravstvenih trditev, je bilo vloženih skupno 44000 vlog . Od tega tudi enajst zdravstvenih trditev za koencim Q₁₀. Predlogi zdravstvenih trditev o koencimu Q₁₀ so navedeni v tabeli II. Evropska agencija za varnost hrane (EFSA) je že pregledala vloge in vse predlagane zdravstvene trditve o koencimu Q₁₀ zavrnila (31).

Tabela II: Predlogi zdravstvenih trditev o koencimu Q₁₀ in razlogi za njihovo zavrnitev(30)

Predlog zdravstvene trditve o koencimu Q₁₀	Razlog za negativno mnenje
»prispeva k normalnemu energetskega metabolizmu«	predložene neustrezne raziskave (na pacientih)
»vzdržuje normalen krvni tlak«	predložene neustrezne raziskave (na pacientih)
»pred oksidativnimi poškodbami ščiti DNA, proteine in maščobe«	predložene neustrezne raziskave (na živalih)
»pripomore k normalnim miselnim sposobnostim«	predložene raziskave niso potrdile trditve
»vzdržuje normalne koncentracije holesterola«	predložene raziskave niso potrdile trditve
»poveča zmogljivost, vzdržljivost«	predložene raziskave niso potrdile trditve

NAJVIŠJE DOVOLJENE KOLIČINE HRANIL/SESTAVIN

Pravilnik o prehranskih dopolnilih (25) podaja najnižje in najvišje dovoljene količine ter priporočen dnevni vnos vitaminov in mineralov. Čezmeren vnos vitaminov in mineralov je lahko zdravju škodljiv, zato pravilnik določa varne mejne količine za te snovi v prehranskih dopolnilih. Predpisane vrednosti potrošniku zagotavljajo varno uporabo proizvodov po navodilih za uporabo, ki jih poda proizvajalec (25,26).

Pravilnik o prehranskih dopolnilih ne določa najnižje in najvišje dovoljene količine koencima Q₁₀ in priporočenega dnevnega vnosa. Ministrstvo za zdravje je leta 2008 objavilo napotke za lažje in boljše razumevanje zakonodaje o prehranskih dopolnilih, kjer

je navedeno, da je v Sloveniji je najvišji dovoljen odmerek koencima Q₁₀ v prehranskih dopolnilih 50 mg na dan (30). Najvišje dovoljene količine koencima Q₁₀ v prehranskih dopolnilih se med posameznimi državami zelo razlikujejo. Na Japonskem je najvišja dovoljena količina 300 mg koencima Q₁₀ na dan, nekoliko nižji odmerek, 200 mg na dan, je dovoljen v Belgiji in Italiji (6). Najvišje dovoljene količine koencima Q₁₀ v posameznih državah so predstavljene v tabeli III.

Tabela III: Najvišje dovoljene količine koencima Q₁₀ v prehranskih dopolnilih

Država	Najvišja dovoljena količina koencima Q₁₀ [mg/dan]
Slovenija	50
Avstralija	150
Italija	200
Belgija	200
Japonska	300

V primeru, da količina posameznega vitamina, minerala ali druge snovi presega najvišjo dovoljeno količino, izdelka ni mogoče tržiti kot prehransko dopolnilo, ampak se razvrsti med zdravila in je zanj potrebno pridobiti dovoljenje za promet (30).

PRVA PRIJAVA

Postopek prve prijave je opisan v Pravilniku o prehranskih dopolnilih (25). Uvoznik ali proizvajalec, ki prvič daje v promet prehransko dopolnilo na območju Republike Slovenije, mora o tem obvestiti Ministrstvo za zdravje.

Vloga mora vsebovati:

- spremni dopis;
- izvirno označbo, če izdelek ni proizveden v Republiki Sloveniji ali proizvodno

- specifikacijo, če je izdelek proizveden v Republiki Sloveniji;
- predlog označbe v slovenskem jeziku, pripravljen v skladu s pravilnikom o prehranskih dopolnilih, vključno z informacijami o prehranskem dopolnilu, ki so na voljo končnemu potrošniku;
 - potrdilo (drugega pristojnega organa), da gre za prehransko dopolnilo, če ni proizvedeno v Republiki Sloveniji;
 - dokazilo o plačilu upravne takse.

Ministrstvo lahko zahteva dodatno strokovno dokumentacijo (znanstveno študijo), da gre za prehransko dopolnilo. Na podlagi prve prijave Ministrstvo za zdravje izda sklep in na svoji spletni strani dopolni seznam prehranskih dopolnil (25). Sklep ne pomeni potrditve skladnosti prehranskega dopolnila, glede sestave in načina označevanja z živilsko zakonodajo in se ne sme enačiti z dovoljenjem za prodajo ali kakršno drugo vrsto dovoljenja (30). To je zgolj seznanitev ministrstva, da je prehransko dopolnilo dano v promet na območju Republike Slovenije. Na podlagi prve prijave Zdravstveni inšpektorat RS lažje preverja skladnost prehranskih dopolnil z zakonodajo (30). Minister, pristojen za zdravje, lahko začasno prepove ali omeji promet s prehranskimi dopolnili kadar obstaja utemeljen sum, da določen izdelek predstavlja nevarnost za zdravje ljudi (25,26).

KAKOVOST

Pravilnik o prehranskih dopolnilih ne posega na področje kontrole kakovosti. Pravega nadzora nad prehranskimi dopolnili ni. Vso odgovornost nad izdelkom nosi nosilec živilske dejavnosti. ZIRS preko rednih vzorčenj preverja odsotnost nevarnih primesi (npr. težke kovine: svinec, kadmij, živo srebro, arzen; policiklični aromatski ogljikovodiki) in poda oceno označbe.

Zasebno podjetje Inštitut za Nutricionistiko navaja, da so izvedli analize vsebnosti nekaterih prehranskih dopolnilih v različnih farmacevtskih oblikah. Kljub širokemu intervalu ustreznosti – vsebnost v razponu od 80 do 150 %, je bilo še vedno precej izdelkov neustrezne kakovosti (manjša vsebnost ali celo odsotnost substance). Rezultati so pokazali, da je velik problem tudi nehomogenost polnilne oziroma tabletirne mase in zato so velike razlike med posameznimi vzorci v enem pakiranju (32).

3.2 ZDRAVILA

Zakon o zdravilih (24) navaja, da je zdravilo vsaka snov ali kombinacija snovi, ki so predstavljene z lastnostmi za zdravljenje, preprečevanje ali ugotavljanje bolezni pri ljudeh ali živalih. Za zdravilo velja tudi vsaka snov ali kombinacija snovi, ki se lahko uporablja pri ljudeh ali živalih z namenom, da bi se ponovno vzpostavile, izboljšale ali spremenile fiziološke funkcije prek farmakološkega, imunološkega ali presnovnega delovanja ali da bi se določila diagnoza. Za razvrstitev izdelka med zdravila je poleg sestave bistvena njegova predstavitev in namembnost. Če je izdelek predstavljen z lastnostmi zdravljenja ali preprečevanja bolezni in bolezenskih stanj tako, da povprečni potrošnik dobi vtis zdravila, se ta razvršča med zdravila. V tem primeru ne sme biti v prometu, dokler zanj ni pridobljeno dovoljenje za promet z zdravilom. Izjemoma dovoljenje za promet ni potrebno za zdravila, ki se klinično preskušajo; so namenjena zdravljenju kot nadaljevanje zdravljenja v tujini; so namenjene nadaljnji predelavi; ki so namenjena za raziskave in razvoj; ki imajo dovoljenje za promet s paralelno uvoženim zdravilom. Glede na način izdaje se zdravila razvrščajo v dve skupini. Ločimo zdravila, za katera je potreben zdravniški recept in zdravila, za katera zdravniški recept ni potreben. Pri zdravilih brez recepta razlikujemo tista, ki so na voljo samo v lekarnah in zdravila, ki so dostopna tudi v posebnih, specializiranih prodajalnah (v Sloveniji označene z zelenim listom) (24).

DOVOLJENJA ZA PROMET Z ZDRAVILOM

Drugo poglavje Zakona o zdravilih (24) se nanaša na dovoljenja za promet z zdravilom. Postopek registracije zdravila se začne s pisno vlogo, ki jo predlagatelj predloži pristojnemu organu za zdravila. V Sloveniji je to Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke. Pridobitev dovoljenja za promet z zdravilom lahko poteka po:

- nacionalnem postopku (dovoljenje za promet z zdravilom v Republiki Sloveniji);
- postopek z medsebojnim priznavanjem (dovoljenje za promet z zdravilom se na osnovi izdanega dovoljenja v eni izmed držav članic Evropske unije razširi še na druge države);
- decentraliziranem postopku (dovoljenje za promet z zdravilom v več državah članicah Evropske unije hkrati);

- centralizirani postopek (dovoljenje za promet z zdravilom na področju celotne Evropske unije).

Predloženi podatki in dokumenti morajo biti v obliki skupnega tehničnega dokumenta (CTD), ki obsega pet modulov. Modul 1 vsebuje administrativne podatke (celotno kazalo, obrazec vloge, povzetek glavnih značilnosti zdravila, besedilo zunanje in primarne ovojnine, navodilo za uporabo, predlog/i oziroma osnutek/ki primarne in zunanje ovojnine, podatke o izvedencih, oceno tveganja za okolje). Modul 2 vsebuje povzetke o kakovosti ter pregled in povzetke neklinične in klinične dokumentacije. Modul 3 vsebuje kemične, farmacevtske in biološke podatke o zdravilni/ih učinkovini/ah ter zdravilu oziroma končnemu izdelku. Modul 4 vsebuje neklinična poročila skupaj z literaturnimi podatki. Modul 5 pa vsebuje tabelaričen prikaz in poročila vseh kliničnih študij ter literaturnih podatkov. Predlagatelj mora spremni dopis in izpolnjene obrazce predložiti v slovenskem jeziku. Ostala dokumentacija je lahko v slovenskem ali angleškem jeziku. Agencija oceni, ali so podatki v vlogi ustrezni in preuči, če so izpolnjeni pogoji za izdajo dovoljenja za promet. Med potekom postopka lahko zahteva dodatno dokumentacijo ali ustrezno pisno ali ustno obrazložitev. Zahteva lahko tudi kontrolo kakovosti zdravila, vhodnih snovi za njegovo izdelavo in če je potrebno tudi kontrolo kakovosti vmesnih spojin ali drugih sestavin v uradnem kontrolnem laboratoriju. Na ta način preveri ustreznost in skladnost kontrolnih metod, ki jih je izdelovalec uporabil in so opisane v dokumentaciji. Najpozneje v 210 dneh od dneva prejema popolne vloge agencija z odločbo izda ali zavrne izdajo dovoljenja za promet. Vmesni čas dopolnjevanja vloge ni vključen v časovni okvir 210 dni. V primeru, da tri zaporedna leta po izdaji dovoljenja za promet zdravilo dejansko ni bilo v prometu, se dovoljenje za promet odvzame. Dovoljenje za promet praviloma velja pet let. Najmanj šest mesecev pred iztekom veljavnosti dovoljenja mora imetnik dovoljenja za promet na agencijo predložiti vlogo za podaljšanje. Dovoljenje se podaljša za nedoločen čas, razen če agencija zahteva ponovno podaljšanje zaradi interesa varovanja javnega zdravja (24).

Z namenom zagotavljanja kakovosti, varnosti in učinkovitosti zdravila ter usklajenosti z veljavnimi predpisi mora predlagatelj v obdobju veljavnosti dovoljenja za promet spremljati tehnični in znanstveni napredek, rezultate spremljanja neželenih škodljivih učinkov ter ostale spremembe v zvezi z zdravilom. Agenciji mora pred uvedbo kakršne koli spremembe sporočiti vse nove informacije, ki lahko vplivajo na spremembo

dovoljenja za promet z zdravilom ali na spremembo dokumentacije o zdravilu. V časovno predpisanih rokih agencija sprejme ali zavrne predlagano spremembo (24).

Seznam zdravil, za katera je bilo izdano dovoljenje za promet z zdravili, in seznam zdravil, za katera je dovoljenje prenehalo veljati oziroma jim je bilo dovoljenje spremenjeno, podaljšano, začasno odvzeto ali odvzeto, agencija objavi v Uradnem listu Republike Slovenije (24).

Natančnejše zahteve glede dovoljenja za promet za zdravila v humani uporabi so navedene v Pravilniku o dovoljenju za promet z zdravilom za uporabo v humani medicini (Ur.l. RS, št. 109/2010).

PRESKUŠANJE ZDRAVIL

Tretje poglavje Zakona o zdravilih (24) opisuje preskušanje zdravil. Preden je zdravilo dano v promet, mora biti skladno z načeli dobrih praks analizo, neklinično farmakološko-toksikološko in klinično preskušeno, da se lahko pridobi ocena njegove kakovosti, varnosti in učinkovitosti. Analizno preskušanje zdravila pomeni farmacevtsko, kemično in biološko preskušanje kakovosti zdravila. Neklinično farmakološko-toksikološko preskušanje je postopek ugotavljanja varnosti zdravila. Opredeliti mora farmakodinamske, farmakokinetične in toksikološke lastnosti zdravila, ki so bile ugotovljene na laboratorijskih živalih, in predvideti možne učinke na ljudeh oziroma ciljnih živalskih vrstah. Klinično preskušanje zdravil je raziskava na zdravih in bolnih ljudeh. Njen namen je odkriti ali potrditi klinične, farmakološke ali druge farmakodinamske in farmakokinetične učinke zdravila v preskušanju ali odkriti neželene učinke zdravila v preskušanju ali preučiti absorpcijo, porazdelitev, presnovo in izločanje zdravila v preskušanju, s ciljem dokazati njegovo varnost ali učinkovitost. Rezultati preskušanj so del registracijske dokumentacije. Opisi testiranj morajo biti dovolj podrobni, da je preskus mogoče ponoviti in primerjati rezultate (24).

Natančnejše zahteve preskušanja zdravil so navedene v Pravilniku o načinu in postopku analiznega, farmakološko-toksikološkega in kliničnega preskušanja zdravil za uporabo v humani medicini (Ur.l. RS, št. 86/2008, 37/2010) in Pravilniku o kliničnih preskušanjih zdravil (Ur.l. RS, št.54/2006).

DOVOLJENJE ZA IZDELAVO ZDRAVIL

Zakon o zdravilih (24) v četrtem poglavju navaja zahteve o dovoljenju za izdelavo zdravil. Zdravila lahko izdelujejo le pravne ali fizične osebe, ki so pridobile dovoljenje za izdelavo zdravil in dejavnost izvajajo v skladu s smernicami in načeli dobre proizvodne prakse. Vsi izdelovalci zdravil so pod ustreznim inšpekcijskim nadzorom, kjer se preverja skladnost proizvodnje z načeli dobre proizvodne prakse (24). Pravilnik o natančnejših pogojih za opravljanje dejavnosti izdelave zdravil in ugotavljanju izpolnjevanja teh pogojev ter o postopku izdajanja ali odvzema potrdila o izvajanju dobre proizvodne prakse (Ur.l. RS, št. 91/2008) navaja natančnejše zahteve dovoljenja za izdelavo zdravil.

OZNAČEVANJE IN NAVODILO ZA UPORABO

Peto poglavje Zakona o zdravilih (24) se nanaša na označevanje zdravil in navodilo za uporabo. Vsako zdravilo, ki se daje v promet, mora biti označeno na zunanji ali na stični ovojnini s podatki o zdravilu in mora imeti priloženo navodilo za uporabo, ki je v skladu s povzetkom glavnih značilnosti. Vse informacije o področju uporabe, učinkovitosti, opozorilih, previdnostnih ukrepih, kontraindikacijah, interakcijah in neželenih učinkih so verodostojne. Označevanje in navodilo za uporabo morajo biti v slovenskem jeziku in čitljivi. Ime zdravila mora biti na obojnini izpisano tudi v Braillovi pisavi (24). Podrobnejše zahteve načina označevanja zdravil, obliko ter vsebino navodila za uporabo natančno predpisuje Pravilnik o označevanju in navodilu za uporabo (Ur.l. RS, št. 54/2006).

FARMAKOVIGILANCA

Farmakovigilanca je predstavljena v sedmem poglavju Zakona o zdravilih (24). Gre za neprekinjen proces v katerem se ugotavlja in reagira na nova spoznanja glede varnosti zdravila med trženjem ali kliničnim preskušanjem. Sistem farmakovigilance, ki zagotavlja zbiranje, vrednotenje ter izmenjavo podatkov, je potreben za varovanje javnega zdravja. Zdravniki, drugi zdravstveni delavci in uporabniki, ki ugotovijo kakršne koli neželene učinke zdravila ali sume nanje, so dolžni najpozneje v petnajstih dneh o tem poročati centru za farmakovigilanco na JAZMP. V sistem farmakovigilance je vključen tudi center za zastrupitve (UKC Ljubljana), ki vodi register neželenih škodljivih učinkov zdravil. Imetnik dovoljenja za promet z zdravilom mora centru za farmakovigilanco glede na predpisane časovne termine za vsako zdravilo predložiti periodično poročilo o varnosti (PSUR). PSUR vsebuje kumulativne podatke o neželenih škodljivih učinkih in dogodkih

ter znanstvene ocene razmerja med koristjo in tveganjem glede na nova spoznanja o zdravilu v času trženja in predlog za spremembe v dovoljenju za promet. Na podlagi podatkov lahko JAZMP odvzame ali začasno odvzame dovoljenje za promet z zdravilom, uvede spremembe dovoljenja ali prepove prodajo zdravila (24). Podrobnejše zahteve za farmakovigilanco so navedene v Pravilniku o farmakovigilanci zdravil za uporabo v humani medicini (Ur.l. RS, št. 53/2006).

KONTROLA KAKOVOSTI

V devetem poglavju Zakona o zdravilih (24) so predstavljene zahteve kontrole kakovosti. Z izdelavo zdravil je tesno povezana kontrola kakovosti, ki se izvaja skozi celoten proces proizvodnje. Začne se že pri surovinah, ki so pred začetkom proizvodnje testirane in na osnovi ustreznih rezultatov sproščene v proizvodnjo. Med postopkom proizvodnje se odvzame vzorce za testiranje končnih izdelkov. Za obstojnost in primerno shranjevanje zdravila do konca roka je pomembna tudi ovojnina, ki je prav tako preverjena. Pred sprostitvijo na trg morajo zdravila dobiti dokončno potrditev o ustreznosti. Po prihodu zdravila na trg se izvaja uradna kontrola kakovosti. V tem procesu uradni kontrolni laboratorij ugotavlja kakovost zdravila z analiznim preskušanjem, preverjanjem analiznih certifikatov, ovojnine, navodila za uporabo zdravila ali drugih dokumentov. Ločimo med redno kontrolo kakovosti vseh zdravil, ki se izvaja vsaj enkrat na pet let za vsako farmacevtsko obliko in jakost zdravila, in izredno kontrolo kakovosti zdravil na zahtevo agencije (24). Več o kontroli kakovosti je navedeno v Pravilniku o analiznem preskušanju zdravil z namenom kontrole kakovosti (Ur.l. RS, št. 91/2008).

4 NAMEN DELA

Učinkovina ubidekarenon je bolj poznana pod imenom koencim Q₁₀. Evropska agencija za varnost hrane ga je opredelila kot varno hranilo in zato ga je dovoljeno uporabljati tudi v

živilski industriji. Uporabnikom je koencim Q₁₀ na voljo v hrani, prehranskih dopolnilih, zdravilih in kozmetičnih izdelkih. Zaradi pogoste uporabe tovrstnih izdelkov je preverjanje kakovosti še kako potrebno. Za določanje vsebnosti proučevane spojine potrebujemo občutljive in selektivne analizne metode, ki so sposobne razlikovati med spojino in njej podobnimi molekulami.

Med izdelki s koencimom Q₁₀ je najpogostejša formulacija oljna suspenzija koencima Q₁₀ v mehkih kapsulah. Zato bo namen našega dela uporabiti ustrezno analitsko metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti za ugotavljanje vsebnosti ubidekarena v mehkih kapsulah. Najprej bomo izbrali analizno metodo jo ustrezno prilagodili in izvedli vrednotenje, da potrdimo primernost kromatografskih pogojev za analizo koencima Q₁₀ na tem sistemu in ugotovimo, če daje zanesljive in ponovljive rezultate. Preverili bomo tudi učinkovitost ekstrakcije koencima Q₁₀ iz izdelka za pripravo vzorčnih raztopin.

Z metodo HPLC bomo analizirali izdelek s koencimom Q₁₀ različnih proizvajalcev. Na osnovi analiz bomo izračunali vsebnost koencima Q₁₀ v posameznem analiziranem izdelku.

Iz literarnih podatkov vemo, da se koencim Q₁₀ v farmacevtskih oblikah lahko istočasno nahaja v oksidirani in reducirani obliki. Vzorce bomo analizirali z in brez dodatka železovega (III) klorida. Iz razmerja odzivov različno pripravljenih vzorcev bomo določili delež reducirane oblike koencima Q₁₀. Proučili bomo tudi vpliv starosti posameznega vzorca na razmerje oblik koencima Q₁₀. Nekaj vzorcev bomo umetno starali v stabilnostni komori pri 40 °C in 75 % vlagi in proučili vpliv staranja na razmerje reducirane in oksidirane oblike.

5 MATERIALI IN METODE

5.1 MATERIALI

5.1.1 SUBSTANCE, REAGENTI, RAZTOPINE

- izdelki A

Fidi koencim 10 mehke kapsule; Fidimed

Deklarirane sestavine: 30 mg koencima Q₁₀ in 24 mg vitamina E

Druge sestavine: 40 mg askorbinske kisline, 12 mg betakarotena, 15 µg selena v medicinskem kvasu, 200 mg medicinskega kvasa, rafinirano in delno hidrogenirano sojino olje, maščobe iz surovega masla, želatina, 85-odstotni glicerol, sorbitol, rdeči železov oksid.

- prva serija (serija: 1338980001; rok uporabe: 05. 2009)

- druga serija (serija: 1341850001; rok uporabe: 08. 2009)

- tretja serija (serija: 1353830001; rok uporabe: 12. 2009)

- četrta serija (serija: 1366180001; rok uporabe: 04. 2010)

- izdelek B

Koencim Q₁₀; Walmark, Bitax; serija: C6A2432; rok uporabe: 01.2009

Deklarirane sestavine: 30 mg koencima Q₁₀

Druge sestavine: sojino olje, želatina, glicerol, lecitin, železov oksid.

- izdelek C

Super Bio-Qinon Q₁₀; Pharma Nord, Mic Mengeš; serija: 0704315; rok uporabe: 06. 2012

Deklarirane sestavine: 30 mg koencima Q₁₀

Druge sestavine: sojino olje, želatina, glicerol, redestilirana voda, d-α-tokoferol, železov oksid.

- izdelek D

Koencim Q₁₀; Natural Wealth, Difar; serija: 365984/10; rok uporabe: 10.2011

Deklarirane sestavine: 30 mg koencima Q₁₀

Druge sestavine: olje riževih otrobov, želatina, lecitin, glicerol, čebelji vosek, sojino olje, titanov dioksid.

- ubidecarenone – C₅₉H₉₀O₄; Mr=863.37 g/mol; pure material (USP reference standard for test & assay)

- ubidecarenone Related Compound A (Coenzyme Q₉) – C₅₄H₈₂O₄; pure material (USP reference standard for test & assay)

- acetonitril - C_2H_3N ; Chromasolv, for HPLC, gradient grade; $M_r=41,05$ g/mol; (Sigma-Aldrich)
- n-heksan; puriss p.a., Reag. Ph Eur (Riedel-de Haën)
- brezvodni etanol – ethanol absolute - C_2H_5OH ; puriss p.a., Reag. Ph Eur (Sigma-Aldrich)
- bidestilirana voda – H_2O (Fakulteta za farmacijo)
- tetrahidrofuran - C_4H_8O ; Chromasolv, for HPLC $M_r=72,1$ g/mol (Sigma-Aldrich)
- železov klorid – Iron (III) chloride anhydrous (Riedel-de Haen)
- *topilo*: n-hexan/brezvodni etanol = 5/2; v/v

5.1.2 NAPRAVE IN PRIBOR

- Digitalni tehtnici AG245 in H54AR (Mettler Toledo)
- UZ kadička Sonis 4 (Iskra)
- Stresalnik Vibromix 403 EVT (Tehtnica)
- Centrifugirka Centric 322A (Tehtnica)
- Klimatska komora VC 4034 (Vötsch Industrie technik)
- Hladilnik LTH
- Avtomatska pipeta 200-1000 μ l (Eppendorf)
- Stekleni inventar: čaše, merilne bučke, kapalke, tehtiči, merilni valji, viala
- Ostalo: spatula, skalpel, alu-folija, Parafilm[®] M
- HPLC sistem 1100 series (Agilent Technologies):
 - kvarterna črpalka
 - avtomatski vzorčevalnik
 - termostat za kolono
 - UV-VIS detektor
 - programska oprema ChemStation
 - kolona: Kromasil 100 C18, 5 μ m, 250 x 4,0 mm

5.2 METODE

5.2.1 VPELJAVA HPLC METODE

5.2.1.1 POGOJI HPLC METODE

kolona: Kromasil 100 C18, 5 μm , 250 x 4,0 mm

temperatura kolone: 25 °C

mobilna faza: acetonitril/tetrahidrofuran/voda (55/40/5; v/v/v)

pretok mobilne faze: 1,5 ml/min

volumen injiciranja: 15 μl

valovna dolžina detekcije: 280 nm

čas analize: 10 min

retencijski čas (t_R): cca 8,6 min (Q_{10})

5.2.1.2 PRIPRAVA MOBILNE FAZE IN STANDARDNIH RAZTOPIN

Priprava mobilne faze

Mobilno fazo smo pripravili iz acetonitrila, tetrahidrofurana in vode v razmerju 55:40:5 (v/v/v). Pred uporabo smo mobilno fazo za deset minut postavili v ultrazvočno kadičko in jo razplinili.

Priprava raztopine FeCl_3

V 100 ml bučko smo natančno natehtali 79 mg železovega (III) klorida in ga raztopili v brezvodnem etanolu.

Priprava standardne raztopine koencima Q_{10} (ubidekarenona)

Natančno smo natehtali približno 10,0 mg referenčnega standarda ubidekarenona in ga raztopili v 10 ml bučki s *topilom*. Tako smo pripravili raztopino z znano koncentracijo 1,0 mg/ml. 0,5 ml te raztopine smo redčili z brezvodnim etanolom tako, da je bila koncentracija nove raztopine približno 50 µg/ml.

Za izdelavo umeritvene premice smo pripravili sedem raztopin različnih koncentracij koencima Q₁₀. Prva raztopina s koncentracijo 50 µg/ml, ki smo jo pripravili v začetku, je osnovna raztopina. Vzeli smo alikvote po 600, 700, 750, 800, 850 in 900 µl osnovne raztopine ter jih v 1 ml bučkah z brezvodnim etanolom redčili do oznake. Na ta način smo pripravili raztopine standarda s koncentracijo 30, 35, 37,5, 40, 42,5 in 45 µg/ml. Po 1 ml tako pripravljenih raztopin smo odpipetirali v viale in analizirali. Vsak vzorec smo analizirali tri zaporedne dni s trikratnim injiciranjem na dan, da bi dokazali ponovljivost rezultatov med dnevi.

Med dnevi smo raztopine standardov shranjevali pri temperaturi 2 do 8 °C v dobro zaprtih vsebnikih.

Po končanem vrednotenju HPLC metode smo standardne raztopine v vialah shranjevali pri sobni temperaturi. Po šestih dneh smo ponovno izvedli meritve. Vsak vzorec smo analizirali s trikratnim zaporednim injiciranjem.

Priprava standardne raztopine koencima Q₉

V topilu smo raztopili natančno natehtano količino koencima Q₉ tako, da je bila koncentracija raztopine 1,0 mg/ml. Del te raztopine smo redčili z brezvodnim etanolom do koncentracije nove raztopine, približno 40 µg/ml. Odmerili smo enaka volumna standardne raztopine koencima Q₉ in standardne raztopine koencima Q₁₀. 1 ml nove raztopine smo odpipetirali v vialo in analizirali s trikratnim zaporednim injiciranjem.

5.2.1.3 PRIPRAVA VZORCEV

Za pripravo vzorca smo štiri kapsule, kar je ekvivalentno 120 mg koencima Q₁₀, prerezali s skalpelom. Vsebino kapsul smo skupaj z ovojnici kvantitativno prenesli v 100 ml bučko. Bučko smo s *topilom* dopolnili do oznake in 30 minut stresali. Del vzorca smo nato 10 minut centrifugirali pri 3200 obratov/minuto. 1 ml supernatanta smo prenesli v 25 ml

bučko, dodali 2,5 ml 0,1 % (m/m) raztopine železovega klorida ter z brezvodnim etanolom dopolnili do oznake. 1 ml tako pripravljene raztopine smo odpipetirali v vialo in analizirali s HPLC z dvakratnim zaporednim injiciranjem. Dodatek železovega (III) klorida pretvori reducirano obliko koencima Q₁₀ (ubikinol) v oksidirano obliko koencima Q₁₀ (ubidekarenon).

Vzorce smo pripravili tudi brez dodatka 0,1 % raztopine železovega (III) klorida in rezultate uporabili za določitev deleža reducirane oblike koencima Q₁₀ v izdelku A. Tako smo 1 ml supernatanta, katerega priprava je opisana v prejšnjem odstavku, prenesli v 25 ml bučko in z brezvodnim etanolom dopolnili do oznake. 1 ml tako pripravljene raztopine smo odpipetirali v vialo in analizirali z dvakratnim zaporednim injiciranjem.

Za preverbo učinkovitosti ekstrakcije smo na morebitno prisotnost zaostalega koencima Q₁₀ testirali tudi usedlino, ki je bila v 100 ml bučki v kateri smo pripravili vzorec iz štirih kapsul. Raztopino smo odlili in nato s spatulo čim večjo količino usedline (približno 90 %) prenesli v 10 ml bučko. Dodali smo 5 ml *topila* in 30 minut stresali. Del vzorca smo nato 10 minut centrifugirali pri 3200 obratov/minuto. 1 ml supernatanta smo prenesli v 10 ml bučko, dodali smo 1 ml 0,1 % raztopine železovega (III) klorida. Z brezvodnim etanolom smo dopolnili do oznake. 1 ml tako pripravljene raztopine smo odpipetirali v vialo in analizirali z dvakratnim zaporednim injiciranjem.

V ta namen smo testirali tudi ovojnice kapsul. Prenesli smo jih v 10 ml bučko, dodali topilo do oznake in 30 minut stresali. 1 ml tako pripravljene raztopine smo odpipetirali v vialo in analizirali z dvakratnim zaporednim injiciranjem.

Topilo je mešanica n-heksana in brezvodnega etanola 5:2 (v/v).

5.2.1.4 VREDNOTENJE HPLC METODE

Vrednotenje metode je zaključek razvoja analizne metode, s katero potrdimo primernost in zanesljivost metode za predvideno analitsko rabo. Vsako novo analitsko metodo je potrebno ovrednotiti, ne glede na to ali smo jo razvili sami ali pa jo uvajamo po navodilih neke druge institucije. Z vrednotenjem metode prikažemo, da je le ta ustrezna za analizo določene substance v danem vzorcu in da daje zanesljive rezultate.

Obseg vrednotenja je podan v farmakopejah ter smernicah Mednarodne konference o

harmonizaciji (International Conference on Harmonisation ICH) za validacijo analiznih metod (33). Vrednotenje je potrebno izvesti delno ali v celoti ob vsaki spremembi analizne metode. ICH smernice določajo naslednje parametre validacije:

- selektivnost /specifičnost (specificity)
- linearnost (linearity)
- območje (range)
- točnost (accuracy)
- natančnost (precision)
- meja zaznavnosti (detection limit)
- meja določitve (quantification limit)
- robustnost (robustness)
- preizkus ustreznosti sistema

Preizkus ustreznosti sistema

Preizkus ustreznosti sistema je sestavni del večine analitičnih procesov in ga moramo opraviti pred vrednotenjem validacijskih parametrov. Testiramo resolucijo, ki prikazuje sposobnost sistema za zadovoljivo ločbo dveh analitov in asimetrijo vrhov, ki izraža popačenje kromatografskega vrha (tailing). Resolucijo izračunamo po enačbi 1, asimetrijo pa po enačbi 2.

Resolucija (enačba 1)

$t_{2,1}$: retencijski časi posamezne komponente

$W_{2,1}$: širina kromatografskega vrha posamezne komponente

Asimetrija $T = \frac{W_{0,05}}{2f}$ (enačba 2)

$W_{0,05}$: širina kromatografskega vrha na 5 % višine vrha

f : širina kromatografskega vrha na bazni liniji od začetka do maksimuma vrha

V ta namen smo analizirali raztopino, ki je vsebovala enaka volumna standardne raztopine Q_{10} in Q_9 , obe v koncentraciji 40 $\mu\text{g/ml}$, katere priprava je opisana v poglavju 5.2.1.2

Priprava mobilne faze in standardnih raztopin. Iz kromatograme smo izračunali resolucijo. Skladno s postopkom priprave standardne raztopine koencima Q₁₀, ki je opisan v poglavju 5.2.1.2 Priprava mobilne faze in standardnih raztopin, smo pripravili standardno raztopino koencima Q₁₀ s koncentracijo 40 µg/ml in jo analizirali s petkratnim zaporednim injiciranjem. Iz kromatograma smo izračunali faktor asimetrije. Na osnovi vseh odzivov pa smo izračunali RSD.

USP farmakopeja v monografiji za ubidekarenon kapsule (34) navaja naslednje kriterije:

$$R \geq 2,5$$

$$T \leq 1,5$$

$$RSD \leq 2 \%$$

Linearnost

Linearnost je sposobnost metode, da znotraj določenega intervala zagotavlja rezultate, ki so prenosorazmerni s koncentracijo analizirane substance v vzorcu. Navadno določimo regresijsko premico najmanjših kvadratov odvisnosti testnih rezultatov od koncentracije preiskovane substance. Rezultate regresijske analize eksperimentalnih podatkov je umeritvena premica z enačbo: odziv = k * koncentracija + n. Korelacijo med odzivom in koncentracijo podajamo s Pearsonovim koeficientom (r) oziroma determinacijskim koeficientom (r²), ki ima pri polni linearni povezavi vrednost 1, v realnih sistemih pa mora biti večji od naprej določene vrednosti.

Z metodo najmanjših kvadratov odklonov povprečnih odzivov smo izdelali umeritveno premico iz sedmih točk v območju med 30 in 50 µg/ml v odvisnosti od koncentracije pripravljenih vzorcev. Umeritveni premici smo določili pripadajočo enačbo premice in determinacijski koeficient (r²).

Kot spodnjo mejo sprejemljivosti smo določili $r^2 \geq 0,9900$.

Območje

Območje analize metode je interval med spodnjim in zgornjim nivojem koncentracije preiskovane substance, ki je smiseln, in v katerem predpisana analizna metoda daje ustrezno natančnost, pravilnost in linearnost.

Predpisano območje po ICH smernicah za validacijo metode s katere se določa vsebnost učinkovine je med 80 in 120 % koncentracije vzorca.

Izbrano delovno območje je bilo od 30 do 50 µg/ml.

Točnost

Pravilnost rezultatov je merilo za ujemanje rezultatov z deklarirano vrednostjo. Pri tem ugotavljamo odstopanje povprečja dobljenih rezultatov od dejanske vrednosti. Izražamo jo kot odstotek ujemanja med izračunanimi in dejanskimi vrednostmi.

Iz enačbe umeritvene premice smo izračunali koncentracije koencima Q₁₀, ki ustrezajo izmerjenim odzivom. Pravilnost rezultatov znotraj dneva in med dnevi smo podali kot odstotek ujemanja med izračunanimi in dejanskimi koncentracijami koencima Q₁₀.

Natančnost

V primeru, da je analiza opravljena na več paralelkah istega vzorca, je natančnost oziroma ponovljivost stopnja skladanja med posameznimi testnimi rezultati. Ponovljivost je natančnost znotraj analize. Merilo za natančnost je standardna deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD).

Za posamezno koncentracijo standardne raztopine smo primerjali stopnjo skladanja treh odzivov po treh zaporednih injiciranjih znotraj dneva in med dnevi. Končni rezultat smo podali kot RSD.

Kot mejo sprejemljivosti smo določili $RSD \leq 2 \%$.

Ugotavljali smo tudi ponovljivost vzorcev. V enem dnevu smo pripravili šest vzorcev iste serije izdelka A in primerjali stopnjo skladanja odzivov. Vsak vzorec smo analizirali trikrat. Končni rezultat smo podali kot RSD.

Kot mejo sprejemljivosti smo določili $RSD \leq 5 \%$.

Meja zaznavnosti (detekcije)

Meja zaznavnosti je najmanjša koncentracija analizirane substance v vzorcu, ki se z določeno metodo še zazna (detektira), vendar ne nujno tudi določi (kvantificira).

ICH smernice dovoljujejo več načinov izračuna meje zaznavnosti. Eden od načinov temelji na standardnem odklonu vrednosti odsekov na ordinati (σ) in na povprečni vrednosti (S) naklonov umeritvenih premic analizirane spojine (enačba 3).

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{S} \quad (\text{enačba 3})$$

Meja določitve (kvantifikacije)

Meja določitve predstavlja najmanjšo koncentracijo analizirane snovi, ki jo pod predpisanimi pogoji metode lahko kvantitativno določimo s sprejemljivo natančnostjo in točnostjo. Izračunamo jo kot je navedeno v enačbi 4.

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{S} \quad (\text{enačba 4})$$

Iz rezultatov umeritvene premice smo s pomočjo linearne regresije določili enačbe umeritvenih premic za vsako posamezno injiciranje v obravnavanem koncentracijskem območju. Iz teh treh enačb smo določili povprečno vrednost odklonov umeritvenih premic (S); iz odsekov na ordinati pa smo izračunali njihov standardni odklon (σ). Dobljene podatke smo uporabili za izračun meje zaznavnosti in meje določitve po enačbah 3 in 4.

5.2.1.5 DOLOČEVANJE VSEBNOSTI KOENCIMA Q₁₀

Najprej smo injicirali 15 μl standardne raztopine koencima Q₁₀ s koncentracijo 40 $\mu\text{g/ml}$. Injiciranje smo ponovili trikrat. Sledilo je injiciranje 15 μl vzorčne raztopine za vsak vzorec pripravljen iz mehkih kapsul izbranih izdelkov. Injiciranje smo ponovili dvakrat za vsak vzorec. Na osnovi ugotovljenih površin kromatografskih vrhov pri retencijskem času približno 8,6 min standardnih in vzorčnih raztopin po enačbi 5 izračunamo vsebnost celokupnega koencima Q₁₀ (ubidekarenona) izraženega v mg na kapsulo.

$$m = 2500 \cdot \left(\frac{C}{N}\right) \cdot \left(\frac{R_v}{R_s}\right) \quad (\text{enačba 5})$$

2500: faktor, izračunan iz redčenja

m: vsebnost celokupnega ubidekarenona izražena v mg na kapsulo

C: koncentracija standardne raztopine koencima Q₁₀ izražena v mg/ml (0,040 mg/ml)

N: število kapsul za pripravo vzorca

R_v: odziv vzorčne raztopine

R_s: odziv standardne raztopine koencima Q₁₀

5.2.1.6 DOLOČANJE DELEŽA REDUCIRANE OBLIKE KOENCIMA Q₁₀

Najprej smo injicirali 15 µl standardne raztopine koencima Q₁₀ s koncentracijo 40 µg/ml. Injiciranje smo ponovili trikrat. Sledilo je injiciranje 15 µl vzorčne raztopine pripravljene brez dodatka raztopine železovega (III) klorida. Injiciranje smo ponovili dvakrat za vsak vzorec. Na osnovi ugotovljenih površin kromatografskih vrhov pri retencijskem času približno 8,6 min standardnih in vzorčnih raztopin smo po enačbi 6 izračunali vsebnost ubidekarenona (oksidirane oblike koencima Q₁₀) izraženo v mg na kapsulo (m₀). Delež reducirane oblike koencima Q₁₀ smo določali samo pri izdelku A.

$$m_0 = 2500 \cdot \left(\frac{C}{N}\right) \cdot \left(\frac{R_{vo}}{R_s}\right) \quad (\text{enačba 6})$$

2500: faktor, izračunan iz redčenja

m₀: vsebnost ubidekarenona (oksidirane oblike koencima Q₁₀) izražena v mg na kapsulo

C: koncentracija standardne raztopine koencima Q₁₀ izražena v mg/ml (0,040 mg/ml)

N: število kapsul za pripravo vzorca

R_{vo}: odziv vzorčne raztopine, pripravljene brez dodatka raztopine železovega (III) klorida

R_s: odziv standardne raztopine koencima Q₁₀

Delež reducirane oblike koencima Q₁₀ (ubikinola) izračunamo po enačbi 7 in je izražen v %.

$$W = \left(\frac{m - m_0}{m} \right) * 100 \quad (\text{enačba 7})$$

W: delež ubikinola (reducirane oblike koencima Q₁₀) v vzorcu izražen v %

m: vsebnost celokupnega koencima Q₁₀ izražena v mg na kapsulo

m₀: vsebnost ubidekarena (oksidirane oblike) izražene v mg na kapsulo

5.3 IZRAČUN IN STATISTIKA

Za izračun vseh rezultatov smo uporabili program Excel 2007, del programskega paketa Microsoft Office 2007, ki teče na Microsoftovi platformi Windows XP. Povprečne vrednosti rezultatov smo izračunali s pomočjo funkcije AVERAGE, standardno deviacijo pa s pomočjo funkcije STDEV. S pomočjo programa Excel 2007 smo pripravili tudi grafe.

6 REZULTATI

6.1 VPELJAVA HPLC METODE

Ker se izdelki s koencimom Q₁₀ široko uporabljajo, je smiselno preverjanje njihove kakovosti. V ta namen potrebujemo občutljive in selektivne analizne metode.

V okviru diplomske naloge smo preverili katere metode določanja koencima Q₁₀ v mehkih kapsulah so opisane v literaturi. USP v monografiji ubidekarenon kapsule navaja metodo za določanje ubidekarena v trdih in mehkih kapsulah. Metoda temelji na tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti z UV detektorjem. Za določitev skupne količine koencima Q₁₀ (oksidiranega in reduciranega) se med postopkom priprave vzorca doda raztopina železovega (III) klorida (34).

Leta 1992 je Andersson na Švedskem izvedel študijo določanja koencima Q₁₀ z reverzno fazno tekočinsko kromatografijo v brezvodnem mediju (metanol in heksan). Študija je pokazala, da reverzno fazni sistem zagotavlja boljšo selektivnost za ločitev analogov koencima Q₁₀ in razgradnih produktov. Mobilna faza je pokazala zelo dobro topnost lipofilne formulacije, kar omogoča večjo raznolikost dela v primerjavi z vodnimi mobilnimi fazami (35).

Leta 2006 je Tang s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z elektrokemičnim detektorjem določal koencim Q₁₀ v prehranskih dopolnilih. Opisna metoda je bila hitra in občutljiva. Koencima Q₉ in Q₁₀ so spremljali na dveh kulometričnih celicah. Koencim se je najprej reduciral in kasneje oksidiriral in ob tem proizvajal tok (36).

Opisana je še ena raziskava, katero je leta 2007 izvedla Orozco s sodelavci. Gre za določanje vsebnosti koencima Q₁₀ v substancah in prehranskih dopolnilih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z UV detektorjem. Tudi v tej metodi so za določitev skupnega koencima Q₁₀ v vzorcih uporabili železov (III) klorid (37).

Naša metoda temelji na USP monografije za ubidekarenon kapsule. Iz nabora analiznih metod smo izbrali najenostavnejšo in najbolj preverjeno metodo. Uvedli smo manjše modifikacije. Ker nismo imeli na voljo kolone opisane v USP monografiji, smo uporabili kolono drugačne dimenzije z enako stacionarno fazo. Zaradi povišanega tlaka na koloni smo se odločili, da zmanjšamo pretok mobilne faze. Zadovoljive rezultate smo dobili pri retencijskem času 8,6 minute. Da bi za pripravo posamezne vzorčne raztopine uporabili

manjše število kapsul s koencimom Q₁₀, smo modificirali predpis priprave vzorcev. Za pripravo vzorcev smo uporabili število kapsul, ki je ekvivalentno vsebnosti 120 mg ubidekarena namesto predpisanih 200 mg.

Kromatografski pogoji pri katerih smo izvedli analize so navedeni v poglavju 5.2.1.1 Pogoji HPLC metode. Izbrano analizno metodo smo ovrednotili in uporabili za analizo izdelkov A, B, C ter D, ki so opisani v poglavju 5.1.1 Substance, reagenti, raztopine.

6.2 VREDNOTENJE HPLC METODE

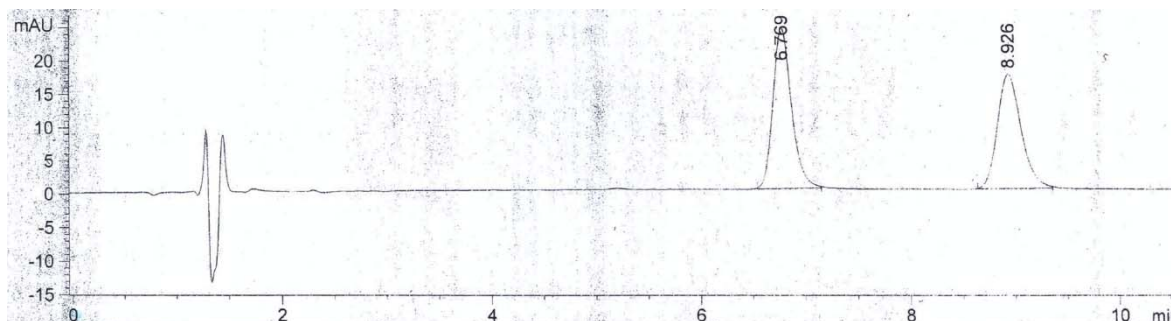
Preizkus ustreznosti sistema

Preizkus ustreznosti sistema smo izvedli skladno s postopkom vrednotenja preizkus ustreznosti sistema, ki je opisana v poglavju 5.2.1.4 Vrednotenje HPLC metode.

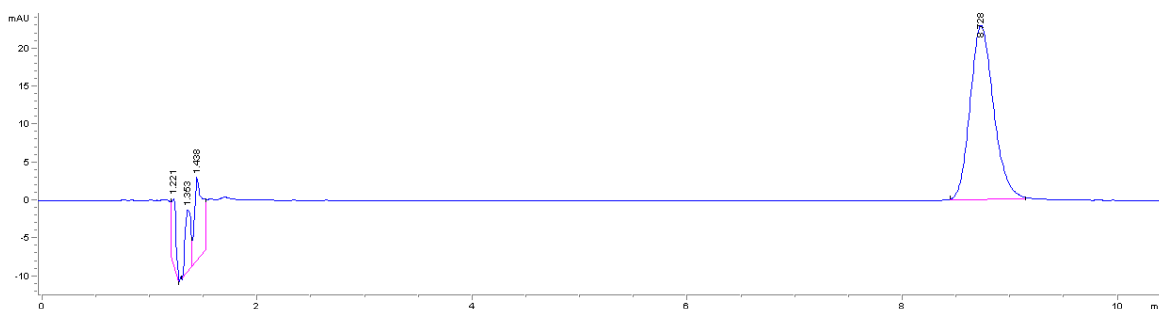
Kromatograma sta predstavljena na sliki 5 in 6. Izračunana vrednost resolucije po enačbi 1 in izračunana vrednost asimetrije po enačbi 2 ter RSD so navedene v tabeli IV.

Tabela IV: Izračunana resolucija in asimetrija sistema pred vrednotenjem metode ter RSD

R	3,14
T	0,90
RSD %	0,13



Slika 5: Kromatogram raztopine koencima Q₉ in Q₁₀ pri izbranih kromatografskih pogojih



Slika 6: Kromatogram standardne raztopine ubidekarena (t_r=8,6 min)
pri izbranih kromatografskih pogojih

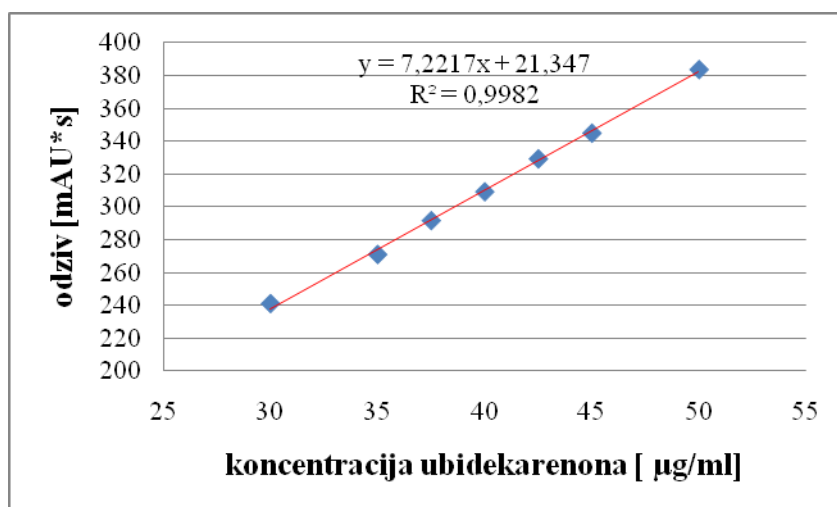
Linearnost in območje

Iz rezultatov, pridobljenih v skladu s postopkom vrednotenja linearnosti v poglavju 5.2.1.4 Vrednotenje HPLC metode, smo s pomočjo linearne regresije za standardne raztopine ubidekarena določili enačbe umeritvenih premic za vsak dan validacije s pripadajočimi determinacijskimi koeficienti (tabela V). Skupna umeritvena premica za ubidekarenon je na sliki 7.

Tabela V: Enačbe umeritvenih premic za ubidekarenon s pripadajočimi determinacijskimi koeficienti

Dan	enačba premice	r ²
1	$y = 7,2216x + 23,390$	0,9980
2	$y = 7,0808x + 23,838$	0,9978
3	$y = 7,3627x + 16,812$	0,9979
Skupno	$y = 7,2217x + 21,347$	0,9982

- povprečje meritev pri posamezni koncentraciji standardne raztopine



Slika 7: Skupna umeritvena premica za ubidekarenon

Točnost in natančnost

Rezultati so bili pridobljeni skladno s postopkom vrednotenja točnosti in natančnosti, ki sta opisana v poglavju 5.2.1.4 Vrednotenje HPLC metode. Rezultati vrednotenja točnosti in natančnosti znotraj dneva ter med dnevi so navedeni v tabeli VI in VII.

Tabela VI: Podatki za izračun točnosti in natančnosti analizne metode za določanje ubidekarenona znotraj dneva ter rezultati

dejanska c [µg/ml]	povprečje odzivov	izračunana c [µg/ml]	točnost [%]	RSD %
30	239,5	30,46	101,52	0,09
35	267,7	34,44	98,40	0,17
37,5	289,2	37,48	99,94	0,17
40	306,4	39,91	99,76	0,13
42,5	325,5	42,60	100,24	0,09
45	342,0	44,93	99,85	0,36
50	379,2	50,19	100,37	0,02
povprečne vrednosti			100,01	0,15

Tabela VII: Podatki za izračun točnosti in natančnosti analizne metode za določanje ubidekarena med dnevi in rezultati

dejanska c [µg/ml]	povprečje odzivov	izračunana c [µg/ml]	točnost [%]	RSD %
30	241,0	30,41	101,36	0,73
35	271,0	34,57	98,76	0,93
37,5	291,7	37,43	99,83	0,74
40	309,3	39,88	99,69	0,71
42,5	329,4	42,66	100,37	0,99
45	345,1	44,84	99,63	0,73
50	384,0	50,22	100,44	0,95
povprečne vrednosti			100,01	0,82

Rezultati ponovljivosti vzorca so bili pridobljeni skladno s postopkom vrednotenja natančnost, ki je opisan v poglavju 5.2.1.4 Vrednotenje HPLC metode in so navedeni v tabeli VIII.

Tabela VIII: Rezultati spremljanja ponovljivosti vzorca

vzorec	1	2	3	4	5	6	Povprečje	RSD %
povprečje odzivov	369,7	371,1	363,0	363,1	368,1	387,6	370,4	2,40

Meja zaznavnosti in meja določitve

Za izračun meje zaznavnosti in meje določitve po enačbah 3 in 4 smo uporabili enačbe umeritvenih premic v koncentracijskem območju 30 do 50 µg/ml. Izračunali smo povprečno vrednost naklonov (S) in SD odsekov na ordinati (σ).

$$S = 7,2217$$

$$\sigma = 3,9335$$

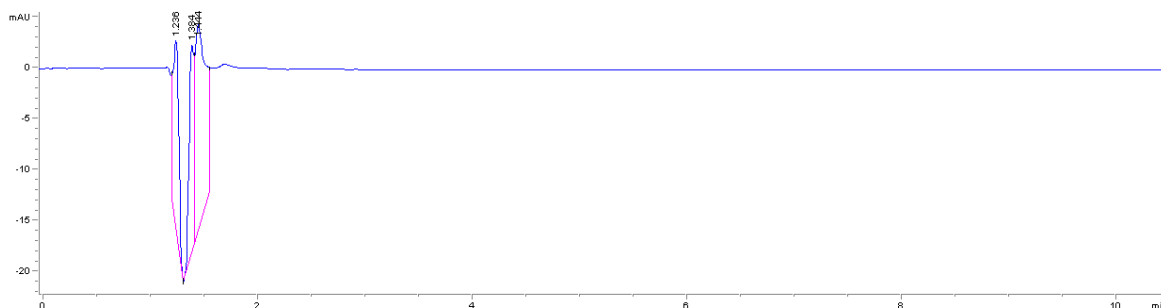
Meja zaznavnosti ubidekarenona pri izbranih pogojih HPLC metode je 1,80 µg/ml. Meja določitve ubidekarenona pri izbranih pogojih HPLC metode je 5,45 µg/ml.

Preverjanje učinkovitosti ekstrakcije

Rezultate o vzorcih usedline in vzorcih ovojníc kapsul smo pridobili v skladu s postopkom preverjanje učinkovitosti ekstrakcije, ki je opisan v poglavju 3.2.1.3 Priprava vzorca. V tabeli IX so prikazani rezultati testiranja vzorcev usedline. Reprezentativni kromatogram vzorčne raztopine ovojníc izdelka A je na sliki 8.

Tabela IX: Odzivi vzorcev usedline

povprečje odzivov		
17,92	18,01	18,23
RSD %		0,88
mQ ₁₀ [mg]		0,65



Slika 8: Reprezentativni kromatogram vzorčne raztopine ovojníc izdelka A
(z dodatkom raztopine FeCl₃)

6.3 DOLOČANJE VSEBNOSTI KOENCIMA Q₁₀

V ta namen smo analizirali štiri vzorce, ki so označeni kot izdelek A, B, C, D in so opisani v poglavju 5.1.1 Substance, reagenti, raztopine. V vseh primerih gre za oljno suspenzijo koencima Q₁₀ v mehkih kapsulah. Vsi izdelki imajo deklarirano vsebnost koencima Q₁₀ 30 mg in so pripravljene skladno z opisom priprava vzorca v poglavju 5.2.1.3 Priprava vzorcev. Vsebnost koencima Q₁₀ v posameznem vzorcu smo izračunali po enačbi 5 kot je

opisano v poglavju 5.2.1.5 Določanje vsebnosti koencima Q₁₀. Proizvajalec A nam je dal na voljo štiri različne serije izdelka (skupno 220 kapsul izdelka A).

Izdelke B, C in D smo kupili v lekarni. Za pripravo vzorcev skladno s postopkom priprava vzorca, ki je naveden v poglavju 5.2.1.3 Priprava vzorcev smo imeli na voljo eno končno pakiranje vsakega od izdelkov.

Vsi rezultati analiz posameznih serij izdelka A so zbrani v tabeli X. Reprezentativni kromatogram vzorčne raztopine izdelka A je na sliki 9. Vsi rezultati analiz izdelka B so zbrani v tabeli XI. Reprezentativni kromatogram vzorčne raztopine izdelka B je na sliki 10. Vsi rezultati analiz izdelka C so zbrani v tabeli XII. Reprezentativni kromatogram vzorčne raztopine izdelka C je na sliki 11. Vsi rezultati analiz izdelka D so zbrani v tabeli XIII. Reprezentativni kromatogram vzorčne raztopine izdelka D je na sliki 12.

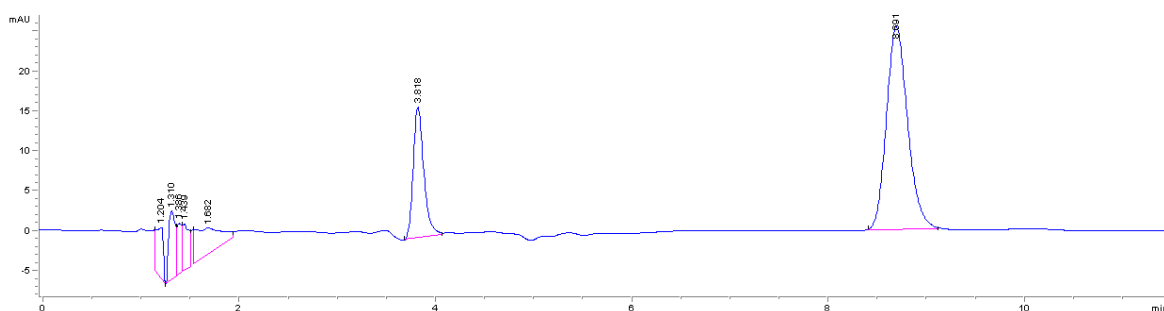
Tabela X: Rezultati določanja vsebnosti celokupnega koencima Q₁₀
v štirih serijah izdelka A

IZDELEK A – prva serija					povprečje
povprečni odziv	355,23	379	370,1	377,1	29,85
določena vsebnost koencima Q ₁₀ v kapsuli [mg]	28,63	30,54	29,83	30,39	

IZDELEK A – druga serija					povprečje
povprečni odziv	385,9	398,43	364,7	362,9	30,46
določena vsebnost koencima Q ₁₀ v kapsuli [mg]	31,10	32,11	29,39	29,25	

IZDELEK A – tretja serija								povprečje
povprečni odziv	369,7	371,1	389,4	363	363,1	368,1	387,6	30,07
določena vsebnost koencima Q ₁₀ v kapsuli [mg]	29,80	29,91	31,38	29,26	29,26	29,67	31,24	

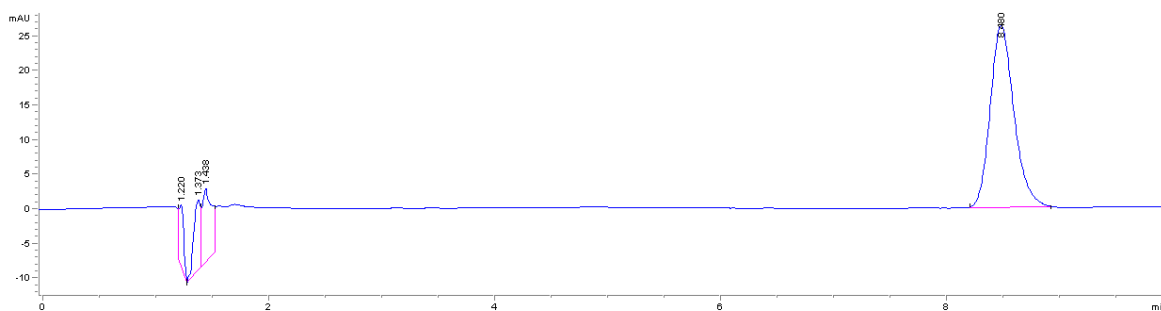
IZDELEK A – četrta serija							povprečje
povprečni odziv	396,5	379,2	381	400,6	384,4	372,6	
določena vsebnost koencima Q ₁₀ v kapsuli [mg]	31,96	30,56	30,71	32,29	30,98	30,03	
povprečni odziv	382,1	371,1	375,3	375	408,4	383,5	
določena vsebnost koencima Q ₁₀ v kapsuli [mg]	30,79	29,91	30,25	30,22	32,91	30,91	
povprečni odziv	386,3	384,1	380,6	383,2	380,5		
določena vsebnost koencima Q ₁₀ v kapsuli [mg]	31,13	30,96	30,67	30,88	30,67		



Slika 9: Reprezentativni kromatogram vzorčne raztopine izdelka A

Tabela XI: Rezultati določanja vsebnosti celokupnega koencima Q₁₀ v izdelku B

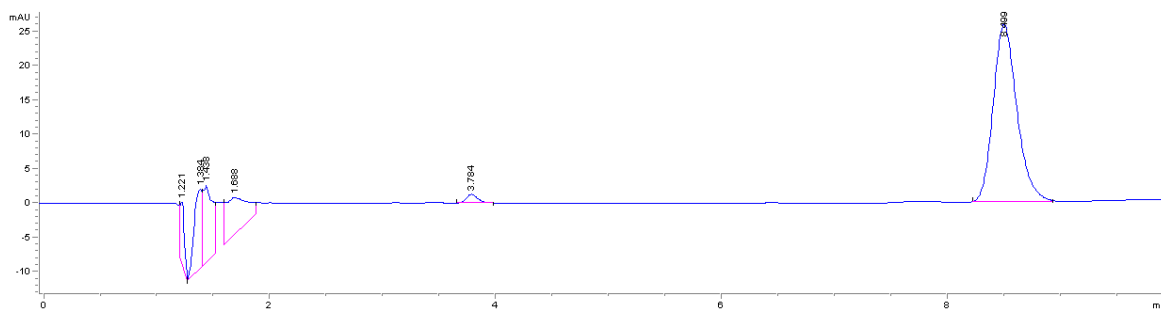
IZDELEK B					povprečje
povprečni odziv	384,9	398,6	390,5	393	
določena vsebnost koencima Q ₁₀ v kapsuli [mg]	31,02	32,12	31,47	31,67	



Slika 10: Reprezentativni kromatogram vzorčne raztopine izdelka B

Tabela XII: Rezultati določanja vsebnosti celokupnega koencima Q₁₀ v izdelku C

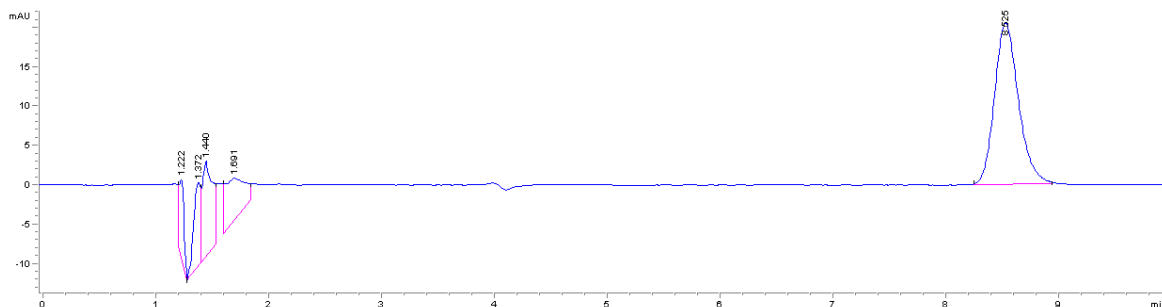
IZDELEK C					povprečje
povprečni odziv	360,6	368,2	379,27	371,6	29,81
določena vsebnost koencima Q ₁₀ v kapsuli [mg]	29,06	29,67	30,57	29,95	



Slika 11: Reprezentativni kromatogram vzorčne raztopine izdelka C

Tabela XIII: Rezultati določanja vsebnosti celokupnega koencima Q₁₀ v izdelku D

IZDELEK D					povprečje
povprečni odziv	371,7	378,8	374,4	376,1	30,24
določena vsebnost koencima Q ₁₀ v kapsuli [mg]	29,96	30,53	30,17	30,31	



Slika 12: Reprezentativni kromatogram vzorčne raztopine izdelka D

Rezultati vsebnosti koencima Q₁₀ izraženi v mg na kapsulo za vse analizirane vzorce so predstavljeni v tabeli XIV.

Tabela XIV: Rezultati vsebnosti koencima Q₁₀ izraženi v mg na kapsulo za analizirane vzorce. Vrednosti so podane kot povprečna vsebnost ± standardni odklon.

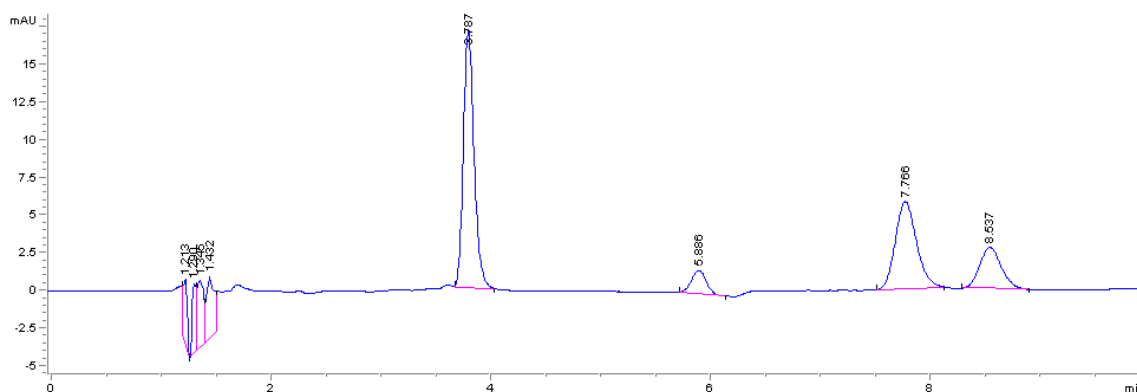
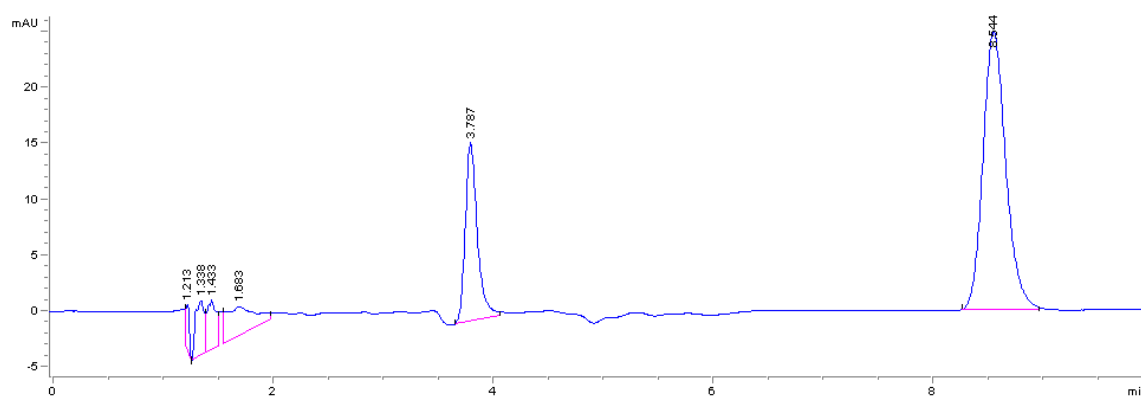
Izdelek	vsebnost koencima Q ₁₀ [mg]	število analiz
A	30,55 ± 2,36	32
B	31,57 ± 0,55	4
C	29,81 ± 0,76	4
D	30,24 ± 0,29	4

6.4 DOLOČANJE DELEŽA REDUCIRANE OBLIKE KOENCIMA Q₁₀

Za določanje deleža reducirane oblike koencima Q₁₀ smo analizirali izdelke A. Vsi vzorci so bili pripravljene skladno z opisom priprava vzorca v poglavju 5.2.1.3 Priprava vzorcev. Vsebnost koencima Q₁₀ v posameznem vzorcu smo izračunali po enačbi 5 kot je opisano v poglavju 5.2.1.5 Določanje vsebnosti koencima Q₁₀. Vsebnost oksidirane oblike koencima Q₁₀ (ubidekarenona) v posameznem vzorcu smo izračunali po enačbi 6 kot je opisano v poglavju 5.2.1.6 Določanje deleža reducirane oblike koencima Q₁₀. Delež reducirane oblike koencima Q₁₀ v posameznem vzorcu smo izračunali po enačbi 7 kot je opisano v poglavju 5.2.1.6 Določanje deleža reducirane oblike koencima Q₁₀. Vzorci izdelka A so bili iz štirih različnih proizvodnih serij in so bili različne starosti. Shranjevani so bili pri temperaturi do 25 °C. Rezultati so podani v tabeli XV. Reprezentativni kromatogram vzorčne raztopine izdelka A, pripravljene brez dodatka raztopine železovega (III) klorida, je na sliki 13. Reprezentativni kromatogram vzorčne raztopine izdelka A, pripravljene z dodatkom raztopine železovega (III) klorida, pa je na sliki 14.

Tabela XV: Delež reducirane oblike koencima Q₁₀ v posamezni seriji izdelka A

Serijska	Datum izteka roka uporabnosti	Starost izdelka v času analize [mesece]	Povprečna vsebnost koencima Q ₁₀ [mg]	Delež reducirane oblike koencima Q ₁₀ [%]
1366180001	04. 2010	2	30,93	13,0
1353830001	12. 2009	6	30,07	20,8
1341850001	08. 2009	10	30,46	42,0
1338980001	05. 2009	13	29,85	79,4

Slika 13: Reprezentativni kromatogram vzorčne raztopine izdelka A (brez dodatka raztopine FeCl₃)Slika 14: Reprezentativni kromatogram vzorčne raztopine izdelka A (z dodatkom raztopine FeCl₃)

Del vzorcev druge in tretje serije izdelka A smo umetno starali v stabilnostni komori dva oziroma sedem tednov pri 40 °C in 75 % vlagi. Vzorci so bili pripravljene skladno z opisom priprava vzorca v poglavju 5.2.1.3 Priprava vzorcev. Vsebnost koencima Q₁₀ v posameznem vzorcu smo izračunali po enačbi 5 kot je opisano v poglavju 5.2.1.5 Določanje vsebnosti koencima Q₁₀. Vsebnost oksidirane oblike koencima Q₁₀ (ubidekarenona) v posameznem vzorcu smo izračunali po enačbi 6 kot je opisano v poglavju 5.2.1.6 Določanje deleža reducirane oblike koencima Q₁₀. Delež reducirane oblike koencima Q₁₀ v posameznem vzorcu smo izračunali po enačbi 7 kot je opisano v poglavju 5.2.1.6 Določanje deleža reducirane oblike koencima Q₁₀. Vzorce posamezne serije smo analizirali pred začetkom umetnega staranja, po dveh tednih in po sedmih tednih shranjevanja v stabilnostni komori. Rezultati določanja deleža reducirane oblike koencima Q₁₀ v umetno staranih izdelkih A so prikazani v tabeli XVI.

Tabela XVI: Delež reducirane oblike koencima Q₁₀ v umetno staranih izdelkih A

Serijska	Datum izteka roka uporabnosti	Čas umetnega staranja (40 °C, 75 % vlaga) [teden]	Povprečna vsebnost koencima Q ₁₀ [mg]	Delež reducirane oblike koencima Q ₁₀ [%]
1353830001	12. 2009	0	30,07	20,8
		2	29,80	87,2
		7	30,52	100,0
1341850001	08. 2009	0	30,46	42,0
		2	31,05	89,4
		7	29,90	100,0

7 RAZPRAVA

Ustrezna in raznolika prehrana naj bi praviloma vsebovala vsa potrebna hranila v zadostnih količinah za normalen razvoj in ohranjanje zdravja. Raziskave so pokazale, da idealno stanje pri vnosu koencima Q_{10} ni doseženo. Ljudje pogosto posegajo po izdelkih s koencimom Q_{10} , njegova uporaba je tako v svetu kot tudi pri nas zelo razširjena. Učinkovitost koencima Q_{10} na različnih področjih potrjujejo številne raziskave. V določenih primerih avtorji navajajo, da so potrebne nadaljnje dobro načrtovane raziskave, ki bodo indikacije potrdile ali ovrgle.

Izdelki s koencimom Q_{10} v različnih farmacevtskih oblikah imajo lahko status prehranskih dopolnil ali zdravil. Velikokrat je v ekonomskem interesu proizvajalca, da izdelek predstavlja kot »več kot živila« in mu posredno z navajanjem indikacij pripisuje zdravilne lastnosti ali pa zavaja uporabnike z navajanjem nedokazanih učinkov. V teh primerih uporabniki še težje ločijo med prehranskimi dopolnili in zdravili, ki so si po izgledu sicer zelo podobna. Z uvedbo enotne evropske zakonodaje na področju zdravstvenih trditev naj bi se stanje na trgu po preteku prehodnega obdobja spremenilo, saj bodo glede na odločitev EFSA-e indikacije za koencim Q_{10} dovoljene le na zdravilih.

Na prvi pogled bi lahko rekli, da sta zakonodaji zdravil in prehranskih dopolnil podobni. Ob natančnem pregledu pa ugotovimo ravno nasprotno. Prva prijava prehranskih dopolnil služi samo uradni evidenci, medtem ko je registracija zdravil proces dokazovanja varnosti in učinkovitosti. Kontrola kakovosti je predpisana in zahtevana samo za zdravila. V primeru prehranskih dopolnil mora uporabnik zaupati proizvajalcu in njegovim navedbam na izdelku. Vsa zdravila so pod skrbnim nadzorom tudi po prihodu na trg, saj je zanje natančno predpisan sistem farmakovigilance, ki zagotavlja zbiranje, spremljanje, vrednotenje in izmenjavo vseh podatkov o zdravilih. Za prehranska dopolnila ni predvidenega sistema, ki bi zagotavljal tovrstno izmenjavo podatkov o prehranskih dopolnilih.

V Sloveniji je bilo od leta 2003 pri ministrstvu za zdravje prijavljenih približno 2700 prehranskih dopolnil. To lahko smatramo kot dokaz, da se proizvajalci rajši odločajo za razvrstitev izdelkov med prehranska dopolnila in se tako izognejo strogim zahtevam, ki so predpisana za zdravila. Pravilno bi bilo, da bi farmacevti ob izdaji izdelkov s koencimom Q_{10} in tudi v drugih podobnih situacijah vedno posegli po zdravilih, saj so ta ustrezno preverjena in imajo dokazano varnost in učinkovitost.

Trenutno še ni zakonske osnove za redno kontrolo vsebnosti posameznega deklariranega hranila v prehranskih dopolnilih. Predvidevamo, da se bo to s časom spremenilo. Takrat bomo nujno potrebovali ustrezne analizne metode za določanje vsebnosti koencima Q₁₀. Na tržišču je največji delež izdelkov s koencimom Q₁₀ v obliki mehkih kapsul, ki vsebujejo oljno suspenzijo koencima Q₁₀. Zato smo se odločili, da izberemo ustrezno analizno metodo za določanje koencima Q₁₀ v mehkih kapsulah.

Najprej smo preverili katere metode določanja koencima Q₁₀ v mehkih kapsulah so opisane v literaturi in jih predstavili v poglavju 6.1 Vpeljava HPLC metode. Izbrali smo najbolj preverjeno metodo, ki je opisana v monografiji za ubidekarenon kapsule v USP farmakopeji (34). Metodo smo nekoliko modificirali. Ker nismo imeli na voljo kolone, ki je predpisana v USP (8 x 100 mm) smo uporabili nekoliko ožjo in daljšo kolono (4 x 250 mm). Stacionarna faza je ostala nespremenjena. Zaradi povišanega tlaka na koloni smo se odločili, da zmanjšamo pretok mobilne faze iz predpisanih 2,5 ml/minuto na 1,5 ml/minuto. Posledično se je zmanjšal tlak na koloni in podaljšal retencijski čas. Z namenom manjše porabe razpoložljivih izdelkov smo modificirali predpis priprave vzorčnih raztopin. Namesto predpisanega ekvivalenta 200 mg po USP metodi smo uporabili ekvivalent 120 mg ubidekarena. Vse vzorce smo pripravili po postopku priprava vzorca, ki je opisan v poglavju 5.2.1.3.

Vsako novo analizno metodo je potrebno ovrednotiti, da potrdimo njeno ustreznost za analizo substance. Zato smo HPLC metode vrednotili znotraj treh dni, kot navajamo v poglavju 5.2.1.4 Vrednotenje analizne metode. Kot je navedeno v poglavju 5.2.1.1 Pogoji HPLC metode je stacionarno fazo predstavljala kolona Kromasil 100 C18, katero smo vzdrževali na konstantni temperaturi 25 °C. Kot mobilno fazo smo uporabili acetonitril, tetrahidrofuran in vodo v razmerju 55:40:5 (v/v/v), katere pretok je znašal 1,5 ml/min. Kromatograme smo posneli pri valovni dolžini 280 nm.

Preizkus ustreznosti kromatografskega sistema smo opravili pred pričetkom vrednotenja HPLC metode. Posneli smo kromatograme in izračunali parametre za ovrednotenje ustreznosti sistema. Izračunana resolucija je 3,14, izračun faktor asimetrije 0,9 ter RSD 0,13 % (tabela IV). Iz rezultatov je razvidno, da je sistem ustrezen, resolucija je večja od 2,5, faktor asimetrije je manjši od 1,5 ter RSD manjši od 2 %.

Linearnost metode smo potrdili z izdelavo umeritvene premice rezultatov analiz sedmih standardnih raztopin koencima Q₁₀ različnih koncentracij. Enačbo umeritvene premice smo določili z metodo najmanjših kvadratov, upoštevali smo povprečno vrednost odzivov po treh injiciranjih in izračunali determinacijski koeficient korelacije (r^2). Enačba umeritvenih premic po posameznih dneh in enačba skupne umeritvene premice so predstavljeni v tabeli V poglavja 6.2 Vrednotenje HPLC metode. Graf skupne umeritvene premice pa je predstavljen na sliki 7. Metoda je linearna v koncentracijskem območju 30 do 50 µg/ml. Delovno območje analize je skladno z območjem linearnosti. Izračunani koeficient korelacije je 0,9982 in je kot zahtevano večji od določene spodnje meje sprejemljivosti 0,9900.

Točnost meritev standardnih raztopin koencima Q₁₀ smo določili s primerjavo dejanskih koncentracij pripravljenih raztopin in tistih, ki smo jih na podlagi odčitanih odzivov analiz izračunali iz umeritvene premice. Podatki za izračun točnosti so skupaj z rezultati za testiranje znotraj dne predstavljeni v tabeli VI, za testiranje med dnevi pa v tabeli VII poglavja 6.2 Vrednotenje analize metode. Izračunana točnost meritev standardnih raztopin koencima Q₁₀ znotraj dneva in med dnevi je bila 100,01 %.

Natančnost meritev standardnih raztopin koencima Q₁₀ smo določili s trikratno ponovitvijo analiz sedmih različnih koncentracij znotraj posameznega dne in med dnevi. Preverjali smo ponovljivost injiciranja. Primerjali smo stopnjo skladanja treh odzivov po treh zaporednih injiciranjih. Končni rezultat smo podali kot RSD. Rezultati natančnosti analiz koncentracij ubidekarena v znotraj dneva so podani v tabeli VI, med dnevi pa v tabeli VII poglavja 6.2 Vrednotenje HPLC metode. Izračunana povprečna RSD znotraj dne je bila 0,15 % in med dnevi 0,82 %. Oba rezultat ustrezata zahtevam, saj je $RSD \leq 2\%$. Spremljali smo tudi ponovljivost vzorcev. V ta namen smo po postopku priprave vzorca, ki je opisan v poglavju 5.2.1.3 pripravili šest vzorcev iste serije izdelka A. Rezultat stopnje skladanja smo podali kot RSD in je 2,4 % ter ne presega meje sprejemljivosti ($RSD < 5\%$). Ta ponovljivost predstavlja tako ponovljivost priprave vzorca kakor tudi variabilnost koencima Q₁₀ v kapsulah znotraj testirane serije. Zato lahko na osnovi rezultatov potrdimo ustreznost priprave vzorca oziroma metode za določanje koencima Q₁₀.

Po enačbi 3 in enačbi 4, ki sta navedeni v poglavju 5.2.1.4 Vrednotenje HPLC metode smo izračunali mejo zaznavnosti in mejo detekcije. Izračunana meja zaznavnosti je 1,80 µg/ml, mejo določitve pa 5,45 µg/ml. Ker meje zaznavnosti in meje detekcije nismo določili v skladu z ICH smernicami so vrednosti informativne. Za izračun smo uporabili

podatke pridobljene na osnovi ekstrapolacije umeritvene premice v območju 30 do 50 $\mu\text{g/ml}$ in ne na osnovi umeritvene premice v nižjem koncentracijskem območju.

Rezultati vrednotenja standardnih raztopin koencima Q_{10} so zelo dobri. Vsi so znotraj meja, ki smo si jih zastavili pred začetkom dela in zato lahko trdimo, da je HPLC metoda ustrezna za kvantitativno določanje vsebnosti celokupnega koencima Q_{10} v mehkih kapsulah.

Izvedli smo tudi dodatna testiranja. Želeli smo preveriti, kako shranjevanje standardnih raztopin koencima Q_{10} pri sobni temperaturi vpliva na rezultate analiz. Standardne raztopine koencima Q_{10} smo pripravljali z uporabo hlapih topil, kot je navedeno v poglavju 5.2.1.2 Priprava mobilne faze in standardnih raztopin. Nekaj standardnih raztopin, katere smo predhodno uporabili za vrednotenje HPLC metode smo v vialah shranjevali pri sobni temperaturi šest dni in jih nato ponovno analizirali. Povprečni odzivi vzorcev standardnih raztopin koencima Q_{10} so bili višji za največ 2 %. Rezultat je potrdil naše predvidevanje, da topila hlapijo in koncentracija standardne raztopine koencima Q_{10} naraste. Zato svetujemo, da se vzorci shranjujejo v hladilniku in v dobro zaprtih vsebnikih.

Za preverbo učinkovitosti ekstrakcije smo na morebitno prisotnost zaostalega koencima Q_{10} testirali usedlino. Vzorce smo pripravili in analizirali skladno z opisom v poglavju 5.2.1.3 Priprava vzorca. Rezultati analiz vzorcev usedlin so podani v tabeli VIII poglavja 6.2 Vrednotenje analizne metode. Glede na izračun po enačbi 5 ta odziv ustreza vrednosti 0,65 mg koencima Q_{10} v eni kapsuli. Faktor redčenja je bil pri pripravi vzorcev usedlin dosti manjši kot pri pripravi vzorcev izdelkov. Predpostavljamo, da smo ob prenosu usedline zajeli tudi nekaj topila, ki je vsebovalo raztopljen koencim Q_{10} . To je razlog za detekcijo manjšega odziva za ubidekarenon pri retencijskem času 8,6 min. Zaključimo lahko, da usedlina ne vsebuje znatnih količin koencima Q_{10} in da je ekstrakcija z izbrano mešanico topil ustrezna. Koencim Q_{10} bi se lahko adsorbiral na površini ovojníc kapsul in zato smo posebej testirali še ovojnice. Skladno z opisom v poglavju 5.2.1.3 Priprava vzorca smo pripravili in analizirali vzorce ovojníc. Na sliki 10 je predstavljen reprezentativni kromatogram vzorčne raztopine ovojníc A. Pri analiziranih vzorcih ovojníc nismo zaznali odziva za ubidekarenon pri retencijskem času 8,6 minute. To je potrditev, da ovojnice ne vsebujejo koencima Q_{10} in da je ekstrakcija uspešna.

Ker je pri pripravi vsakega vzorca potrebno 30 minutno stresanje smo izvedli dva načina mešanja in primerjali dobljene rezultate. Nekaj vzorcev smo pripravili z ročnim stresanjem, druge pa s stresanjem na stresalniku. Rezultati dobljeni pri vzorcih, ki smo jih stresali na stresalniku se ne razlikujejo od tistih, ki smo jih pripravili z ročnim stresanjem. Na osnovi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da način stresanja nima vpliva na končni rezultat. Zaradi lažje in hitrejše priprave vzorcev smo večino izmed teh pripravili na stresalniku.

Tekom analiz je bil nekajkrat opažen rahel trend skrajševanja retencijskih časov (največ 9,3 %). Vzrok temu je najverjetneje porast temperature v laboratoriju tekom izvajanja analiz. Opažena sprememba retencijskih časov pa ni vplivala na odzive inštrumenta in s tem na točnost dobljenih rezultatov. To smo kasneje potrdili s ponovitvijo analiz izbranih vzorcev, saj so bili dobljeni rezultati povsem primerljivi s prvotnimi ugotovitvami. Vpliv zunanjih dejavnikov bi lahko zmanjšali z izvedbo analize v klimatiziranih prostorih.

Po končani vrednotenju HPLC metode smo analizirali realne vzorce izdelkov s koencimom Q_{10} . **V skladu z namenom diplomskega dela so predstavljeni rezultati analiz eksperimentalni rezultati in tudi glede na število vzorcev ne predstavljajo nekih uradnih karakteristik obravnavanih izdelkov.** V analiziranih vzorcih smo določali vsebnost celokupnega koencima Q_{10} . Rezultati vseh analiz izdelka A so predstavljeni v tabeli X, izdelka B v tabeli XI, izdelka C v tabeli XII in izdelka D v tabeli XIII poglavja 6.3 Določanje vsebnosti koencima Q_{10} . Na slikah 9, 10, 11 in 12 so prikazani reprezentativni kromatogrami vzorčnih raztopin izdelka A, B, C in D. Vsi analizirani izdelki vsebujejo koencim Q_{10} v intervalu od 27 do 33 mg. Najmanjša določena količina koencima Q_{10} v eni kapsuli je bila 28,63 mg. Najvišja ugotovljena vsebnost koencima Q_{10} v eni kapsuli pa je bila 32,91 mg. Rezultati vsebnosti koencima Q_{10} izraženi v mg na kapsulo so skupaj s povprečno vsebnostjo navedeni v tabeli XIV. Pričakovali smo, da bomo opazili razliko v vsebnosti koencima Q_{10} med vzorci, ki so razvrščeni v skupino prehranskih dopolnil in zdravilom. Na podlagi izračunanih vrednosti koencima Q_{10} v kapsuli lahko zaključimo, da ni bistvene razlike med vsebnostjo koencima Q_{10} v prehranskih dopolnilih in zdravilu.

Ker smo od proizvajalca pridobili štiri serije izdelka A, smo imeli možnost spremljati spreminjanje vsebnosti koencima Q_{10} v posameznih serijah z različnim rokom uporabnosti. Vsi rezultati so zbrani v tabeli XV v poglavju 6.3 Določanje vsebnosti koencima Q_{10} .

Dobljeni rezultati celokupnega koencima Q₁₀ so v intervalu od 29,85 do 30,93 mg. Na osnovi tega lahko sklepamo, da se vsebnost celokupnega koencima Q₁₀ ohranja skozi daljše časovno obdobje.

Skladno z zahtevami monografija za ubidekarenon kapsule (34) smo v postopku priprave vzorcev dodajali raztopino železovega (III) klorida. Ta predpis smo modificirali in vzorce pripravili brez dodatka železovega (III) klorida. V ta namen smo vzorce izdelka A pripravljali v dveh paralelkah z in brez dodatka železovega (III) klorida, kot je opisano poglavju 5.2.1.3 Priprava vzorcev in jih analizirali. Na sliki 13 je reprezentativni kromatogram vzorčne raztopine izdelka A brez dodatka raztopine železovega (III) klorida. V kromatogramu sta dva dodatna vrha z retencijskim časom 5,9 in 7,7 minute. Na sliki 14 je predstavljen reprezentativni kromatogram vzorčne raztopine izdelka A z dodatkom raztopine železovega (III) klorida. V tem primeru ni več dodatnih vrhov ampak samo vrh ubidekarena pri retencijskem času 8,6 minute. Predpostavljamo, da eden izmed dodatnih vrhov pripada reducirani obliki koencima Q₁₀ (ubikinolu). Naše predpostavke nismo mogli potrditi, ker standard ubikinola ni na voljo. Na osnovi rezultatov smo izračunali deleže reducirane oblike koencima Q₁₀, ki so predstavljeni v tabeli XV.

Nekaj izdelkov A smo shranjevali v stabilnostni komori pri 40 °C in 75 % vlagi in jih na ta način umetno starali. Vzorce izdelkov smo testirali pred začetkom umetnega staranja ter po dveh in sedmih tednih umetnega staranja. Vzorce smo pripravili v dveh paralelkah z in brez dodatka železovega (III) klorida, kot je opisano poglavju 5.2.1.3 Priprava vzorcev in jih analizirali. Na osnovi rezultatov smo izračunali deleže reducirane oblike koencima Q₁₀, ki so predstavljeni v tabeli XVI. Pri vzorcih, katere smo pripravili z dodatkom železovega (III) klorida, smo v drugi seriji izdelka A določili od 29,90 do 31,05 mg koencima Q₁₀, v tretji seriji pa od 29,8 do 30,52 mg koencima Q₁₀ v eni kapsuli. Ugotovili smo, da se delež reducirane oblike s časom povečuje.

8 ZAKLJUČEK

Na osnovi analiz mehkih kapsul s koencimom Q₁₀ smo prišli do naslednjih zaključkov.

Uporabljena metoda je deloma modificirana farmakopejska metoda, ki je linearna v območju 30 do 50 µg/ml, kjer pričakujemo odzive ubidekarenona v izbranih izdelkih. Tako znotraj dneva kot tudi med dnevi daje ponovljive (RSD je 0,09 - 0,36 %; 0,71- 0,99 %) in točne rezultate (točnost je 98,40 – 101,52 %; 98,76 – 101,36 %) za določanje vsebnosti koencima Q₁₀ v standardnih raztopinah preko izbranega koncentracijskega območja. Iz rezultatov preizkusa ustreznosti kromatografskega sistema (R je 3,14; T je 0,90; RSD je 0,13 %) je razvidno, da je sistem ustrezen saj vsi parametri ustrezajo zahtevam farmakopeje (34).

Pri pripravi vzorca je ekstrakcija lipofilne molekule ubidekarenona ustrezna. To smo potrdili s testiranjem usedline in ovojníc kapsul. V usedlini smo detektirali le minimalne količine koencima Q₁₀ in jim ne predpisujemo vpliva na rezultate analiz. Ovojnice ne vsebujejo količin koencima Q₁₀, ki bi jih lahko z izbrano analitsko metodo pod izbranimi kromatografskimi pogoji detektirali. S spremljanjem ponovljivosti vzorca, ki predstavlja tako ponovljivost priprave vzorca kakor tudi variabilnost koencima Q₁₀ v kapsulah znotraj testirane serije smo potrdili ustrezno pripravo vzorca. RSD vrednost ni presegla meje sprejemljivosti 5 %. Metoda daje ponovljive rezultate za določanje celokupne vsebnosti koencima Q₁₀.

Vsi testirani vzorci vsebujejo koencim Q₁₀ v intervalu 27 do 33 mg. Najmanjša določena količina koencima Q₁₀ v vseh analiziranih izdelkih različnih proizvajalcev v eni kapsuli je 28,63 mg. Najvišja določena količina koencima Q₁₀ v eni kapsuli izdelka pa je 32,91 mg. S spremenjeno metodo, ki ne vključuje dodatka železovega (III) klorida smo ugotovili, da je v analiziranih vzorcih že prisotna reducirana oblika koencima Q₁₀, ki se s časom shranjevanja povečuje. Pri čemer ostaja celokupna vsebnost koencima Q₁₀ znotraj intervala 29,80 - 31,05 mg. V skladu z namenom diplomskega dela so predstavljeni rezultati analiz eksperimentalni rezultati in tudi glede na število vzorcev ne predstavljajo nekih uradnih karakteristik obravnavanih izdelkov.

9 LITERATURA

1. Rus P, Rus RR: Koencim Q10. Zdrav Var 2008; 47:89-98.
2. Pavlin R: Ubikinon (koencim Q10). Zdrav Vestn 1997; 66:137-40.
3. European Pharmacopoeia 7th Edition, Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare of the Council of Europe (EDQM), Strasbourg Cedex, France 2010.
4. Žmitek J, Žmitek K: Koencim Q10 kot prehransko dopolnilo in zdravilo. Farm Vest 2009;60:150-7.
5. Barry R: Moč ubikinola: Kaneka QH: ključ do energije, vitalnosti in zdravega srca, Bimedia, Ljubljana, 2008.
6. Coenzyme Q10, ERNA Information Fact Sheets.
7. Coates PM et al: Encyclopedia of Dietary Supplements Second Edition, Marcel Dekker, New York, 2005: 157-65.
8. Littarru GP: Coenzyme Q10:From biochemistry to medicine. The Metabolic Approach Forum on www.st-hs.com
9. Pravst I, Žmitek K, Žmitek J: Coenzyme Q10 contents in foods and fortication strategies. Crit Rev Food Sci Nutr 2010; 50(4):269-80.
10. Povzetek glavnih značilnosti zdravila za Fidi koencim 10 mehke kapsule. <http://www.zdravila.net>; december 2010.
11. Pavlin R: Koencim Q10 – klinična raba. Zdrav Vest 2008; 77:159-62.
12. Coenzyme Q-10. Natural Medicines Comprehensive Database. <http://www.naturaldatabase.therapeuticresearch.com>
13. Soja AM, Mortensen SA: Treatment of congestive heart failure with coenzyme Q10 illuminated by meta-analyses of clinical trials. Mol Aspects Med 1997; 18 Suppl:S159-68.

14. Tran MT, Mitchell TM, Kennedy DT, Giles JT: Role of coenzyme Q10 in chronic heart failure, angina, and hypertension. *Pharmacother* 2001; 21(7):797-806.
15. Baggio E, Gandini R, Plancher AC, Passeri M, Carosino G: Italian multicenter study on the safety and efficacy of coenzyme Q10 as adjunctive therapy in heart failure (interim analysis). *The CoQ10 Drug Surveillance Investigators. Clin Investig* 1993; 71(8 Suppl): S145-9.
16. Rosenfeldt FL et al: Coenzyme Q10 in the treatment of hypertension: a meta-analysis of the clinical trials. *J Hum Hypertens*. 2007; 21(4):297-306.
17. Thomas SR et al: Dietary cosupplementation with vitamin E and coenzyme Q(10) inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E gene knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21(4):585-93.
18. Shults CW, Oakes D, Kieburtz K, Beal MF, Haas R, Plumb S, Juncos JL, Nutt J, Shoulson I, Carter J et al. Effects of Coenzyme Q10 in early Parkinson disease:evidence of slowing of the functional decline. *Arch Neurol* 2002; 59:1541-1550.
19. Huntington Study Group. A randomised, placebo-controlled trial of coenzyme Q10 and remacemide in Huntington's disease. *Neurology* 2001;57:397-404.
20. Balercia G et al: Coenzyme Q(10) supplementation in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: an open, uncontrolled pilot study. *Fertil Steril*. 2004;81(1):93-8.
21. Langsjoen PH: The clinical use of HMG CoA-reductase inhibitors and the associated depletion of coenzyme Q10. A review of animal and human publications. *Biofactors*. 2003; 18(1-4): 101-11.
22. Hathcock JN, Richardson, Shao A, Jennings S: Coenzyme Q10 (Ubiquinone) in "The risk assessment and safety of bioactive substances in food supplements. *IADSA*, June 2006: 26-35.
23. Engelson J, Nielsen JD, Winther K: Effect of coenzyme Q10 and Ginko biloba on Warfarin Dosage in stable, long-term warfarin treated outpatients. A

- randomised, double blind, placebo-crossover trial. *Thromb Haemost* 2002; 87:1075-6.
24. Zakon o zdravilih (ZZdr-1); Ur.l. RS, št. 31/2006, 45/2008.
25. Pravilnik o prehranskih dopolnilih. Uradni list RS; št. 82/03, 44/04 in 72/05, 22/07, 104/2010.
26. DIREKTIVA 2002/46/ES EVROPSKEGA PARLAMENTA IN SVETA z dne 10. junija 2002 o približevanju zakonodaj držav članic o prehranskih dopolnilih; UL L št.183: 51-7, 12.7.2002.
27. Pravilnikom o splošnem označevanju predpakiranih živil. Uradni list RS; št. 50/2004, 58/04, 43/05, 64/05, 83/05, 115/05, 118/07.
28. Uredba (ES) št. 1924/2006 Evropskega Parlamenta in Sveta z dne 20. decembra 2006 o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih; UL L št. 404/9: 9-25, 30.12.2006.
29. Pravilnik o razvrstitvi zdravilnih rastlin. Uradni list RS; št. 133/2008.
30. Napotki za lažje in boljše razumevanje zakonodaje o prehranskih dopolnilih. Ministrstvo za zdravje, Inštitut za varovanje zdravja RS, Zdravstveni inšpektorat RS, Javna agencija za zdravila in medicinske pripomočke, Zveza potrošnikov Slovenije; Ljubljana, 2008.
31. European Food Safety Authority (EFSA) www.efsa.europa.eu
32. Inštitut za Nutricionistiko: Zdravstvene trditve na živilih in prehranskih dopolnilih. Ljubljana, 1. December 2010. Zbornik predavanj
33. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). November 2005.
34. U.S. Pharmacopeia USP 34-NF29, U.S. Pharmacopeia Twinbrook Parkway, Rockville, 2010: 1243-4.

35. Andersson S: Determination of coenzyme Q by non-aqueous reversed- phase liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1992; 606(2):272-6.
36. Tang PH: Determination of coenzyme Q10 in over-the-counter dietary supplements by high-performance liquid chromatography with coulometric detection. *J AOAC Int.* 2006; 89(1):35-9.
37. Orozco D, Skamarack J, Reins K, Titlow B, Lunetta S, Li F, Roman M: Determination of ubidecarenone (coenzyme Q10, ubiquinol-10) in raw materials and dietary supplements by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: single-laboratory validation. *J AOAC Int.* 2007; 90(5):1227-36.