

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASMINA PUTANEC

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASMINA PUTANEC

**VREDNOTENJE OKSIDATIVNE NESTABILNOSTI
UBIDEKARENONA Z METODO TEKOČINSKE
KROMATOGRFIJE VISOKE LOČLJIVOSTI**

**EVALUATION OF OXIDATIVE INSTABILITY OF
UBIDECARENONE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju doc. dr. Robertu Roškarju za vse napotke in strokovne nasvete, ki so me vodili pri delu, prav tako za vso pomoč pri pisanju in izdelavi diplomske naloge. Hvala tudi vsem ostalim sodelavcem na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko za nasvete in pomoč.

Za vso podporo in pomoč pri študiju se najlepše zahvaljujem družini in prijateljem.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom doc. dr. Roberta Roškarja.

Jasmina Putanec

Predsednik diplomske komisije:

prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm.

Član diplomske komisije:

asist. dr. Simona Mencej Bedrač, mag. farm.

Ljubljana, maj 2012

VSEBINA

VSEBINA	I
POVZETEK.....	III
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD.....	1
1.1 PREHRANSKA DOPOLNILA	1
1.2 POMEMBNEJŠI ANTIOKSIDANTI V PREHRANSKIH DOPOLNILIH	3
1.2.1 KOENCIM Q 10.....	3
1.2.2 VITAMIN C.....	11
1.2.3 VITAMIN E.....	12
1.2.4 KVERCETIN	13
1.2.5 ELAGIČNA KISLINA	14
1.3 OKSIDACIJA	15
1.3.1 Splošno.....	15
1.3.2 Dejavniki vpliva na oksidacijo v farmacevtskih oblikah	17
1.3.3 Preprečevanje oksidacije	18
1.3.4 Nastanek radikalov in preprečevanje oksidacije v bioloških sistemih.....	19
2 NAMEN DELA.....	21
3 MATERIALI IN METODE	22
3.1 MATERIALI.....	22
3.1.1 REAGENTI, RAZTOPINE, SUBSTANCE	22
3.1.2 NAPRAVE IN PRIBOR.....	23
3.2 ANALIZNE METODE	23
3.2.1 Pogoji HPLC metode za vrednotenje ubikinona	23
3.2.2 Pogoji HPLC metode za vrednotenje askorbinske kisline	24
3.2.3 Pogoji LC-MS metode za identifikacijo ubikinola	24
3.3 PRIPRAVA VZORCEV	25
3.3.1 Priprava standardnih raztopin	25
3.3.2 Identifikacija ubikinola z LC-MS	26
3.3.3 Stabilnost pripravkov s CoQ10.....	26
3.3.4 Stabilnost standarda CoQ10.....	27
3.3.5 Stabilnost CoQ10 ob prisotnosti askorbinske kisline in ostalih antioksidantov	27
3.3.6 Stabilnost CoQ10 ob prisotnosti reducentov	28
3.3.7 Stabilnost CoQ10 v različnih medijih.....	30
3.3.8 Stabilnost askorbinske kisline v različnih medijih	30
3.4 VREDNOTENJE HPLC METODE.....	30
3.4.1 Selektivnost.....	31
3.4.2 Linearnost	31
3.4.3 Območje linearnosti.....	32
3.4.4 Ponovljivost.....	32

3.4.5	<i>Točnost</i>	32
3.4.6	<i>Izkoristek ekstrakcije</i>	33
3.4.7	<i>Meja zaznavnosti</i>	33
3.4.8	<i>Meja določitve</i>	33
3.4.9	<i>Stabilnost vzorcev</i>	33
3.4.10	<i>Robustnost</i>	34
3.5	OBDELAVA PODATKOV.....	35
4	REZULTATI	36
4.1	VREDNOTENJE HPLC METODE.....	36
4.1.1	<i>Selektivnost</i>	36
4.1.2	<i>Linearnost</i>	39
4.1.3	<i>Točnost, ponovljivost</i>	40
4.1.4	<i>Izkoristek ekstrakcije</i>	41
4.1.5	<i>Meja zaznavnosti in določitve</i>	41
4.1.6	<i>Stabilnost vzorcev</i>	41
4.1.7	<i>Robustnost</i>	42
4.2	IDENTIFIKACIJA UBIKINOLA Z LC-MS.....	43
4.3	STABILNOST PRIPRAVKOV S CoQ10.....	43
4.4	STABILNOST STANDARDA CoQ10	44
4.5	STABILNOST CoQ10 OB PRISOTNOSTI ASKORBINSKE KISLINE IN OSTALIH ANTIOKSIDANTOV	45
4.5.1	<i>Dodatek askorbinske kisline pri različnih temperaturah</i>	45
4.5.2	<i>Dodatek ostalih antioksidantov</i>	47
4.6	STABILNOST CoQ10 OB PRISOTNOSTI REDUCENTOV	49
4.6.1	<i>Dodatek DTT pri različnih temperaturah</i>	49
4.6.2	<i>Dodatek Na₂S pri različnih temperaturah</i>	51
4.6.3	<i>Dodatek reducirajočih spojin</i>	54
4.6.4	<i>Primerjava različnih reducentov na stabilnost oQ10</i>	54
4.7	STABILNOST CoQ10 V RAZLIČNIH MEDIJIH	57
4.7.1	<i>Stabilnost CoQ10 v rastlinskih oljih</i>	57
4.7.2	<i>Stabilnost pripravkov s CoQ10</i>	57
4.8	STABILNOST ASKORBINSKE KISLINE V RAZLIČNIH MEDIJIH	58
5	RAZPRAVA	61
6	SKLEP	69
7	LITERATURA	71

POVZETEK

Prehranska dopolnila z ubikinonom oz. koencimom Q10 so zelo pogosta na tržišču in so na voljo v več oblikah. Najpogostejše so oljne suspenzije ubikinona in ubikinola, medtem ko imajo najboljšo biološko uporabnost vodotopne oblike ubikinona, pri katerih je vgrajen v notranjost β -ciklodekstrinov. Ubikinon je pomemben endogeni lipidotopni antioksidant in sodeluje pri prenosu elektronov v dihalni verigi celičnega dihanja. Ker zakonodaja na področju prehranskih dopolnil ne zahteva ustreznega nadzora kakovosti, so dodatne informacije o kakovosti tovrstnih izdelkov še kako pomembne. Namen našega dela je bil podrobneje proučiti oksidativno nestabilnost ubikinona, saj je bilo v predhodni diplomski nalogi ugotovljeno zmanjšanje vsebnosti ubikinona v mehkih želatinastih kapsulah skozi daljše časovno obdobje (38). Privzeli smo uporabljeno HPLC analizo metodo za kvantitativno določanje vsebnosti ubikinona, vendar smo najprej z validacijo potrdili selektivnost, natančnost, linearnost, točnost metode za namene proučevanja stabilnosti. Najprej smo izbrali dva izdelka s slovenskega tržišča in ju za 6 tednov izpostavili 40°C in 75% relativne vlažnosti in ugotovili izrazit upad vsebnosti ubikinona pri izdelku, ki je poleg ubikinona vseboval tudi askorbinsko kislino. Medtem ko v drugem izdelku, ki je vseboval le ubikinon, nismo ugotovili upada vsebnosti. Zato smo se odločili preveriti stabilnost vzorcev standarda ubikinona, pripravljenih v brezvodnem etanolu, in izkazalo se je, da je ubikinon stabilen v izbranem temperaturnem območju (25-60°C). Z dodajanjem različnih antioksidantov (askorbinske kisline, elagične kisline, vitamina E, kvercetina) pri 40°C v treh različnih razmerjih antioksidanta smo ugotovili, da je ubikinon stabilen, le pri dodatku askorbinske kisline pri najvišji koncentraciji (670 $\mu\text{g/mL}$) je opazen značilen upad deleža ubikinona, kar je dokaz, da deluje askorbinska kislina kot reducent ubikinona. Zato smo v nadaljevanju preverili tudi vpliv drugih izbranih reducentov (ditiotreitola (DTT) in natrijev sulfid (Na_2S)) na oksidativno nestabilnost ubikinona. V največjem obsegu se je ubikinon reducirjal ob prisotnosti Na_2S pri najvišji koncentraciji reducenta (3,8 mM). Dvig temperature nad 40°C ni prispeval k še večjemu znižanju deleža ubikinona, kar kaže da je koncentracija reducenta odločilen dejavnik destabilizacije ubikinona. Nekoliko šibkejši reducent je bil DTT, saj je potek reakcije počasnejši. Medtem ko pri obeh reducirajočih spojinah HCOOH in Fe^{2+} ni bilo opaženih sprememb v deležu oksidirane Q10. V nadaljevanju smo preverili stabilnost ubikinona v nekaterih rastlinskih oljih ter ugotovili,

da je ubikinon v oljih precej bolj stabilen kot pa v brezvodnem etanolu. Sklepali smo, da je za upad vsebnosti ubikinona odgovorna askorbinska kislina, zato smo v zaključku preverjali še stabilnost askorbinske kisline pri 25 in 40°C v treh različnih medijih (vodi, 50% etanolu in brezvodnemu etanolu), pri čemer smo za vrednotenje askorbinske kisline uporabili drugo HPLC metodo. Pogoje za vrednotenje stabilnosti askorbinske kisline smo izbrali z namenom, da bi ugotovili vpliv temperature in različnega medija. Izkazalo se je, da je askorbinska kislina najbolj stabilna v brezvodnem etanolu pri 25°C in pri najvišji koncentraciji (670 µg/mL). Iz pridobljenih rezultatov lahko sklepamo, da askorbinska kislina reducira ubikinon, kar potrjuje upad vsebnosti ubikinona v izdelku, ki je vseboval tudi askorbinsko kislino.

SEZNAM OKRAJŠAV

AK: askorbinska kislina

ACN: acetonitril

ATP: adenzin trifosfat

DTT: ditiotreitol

EA: elagična kislina

EtOH: etanol

HDL: lipoproteini visoke gostote (high density lipoprotein)

HPLC: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high performance liquid chromatography)

HMG-CoA: 3-hidroksi-3-metil-glutaril koencim A

ICH: Mednarodna konferenca o harmonizaciji (International Conference on Harmonisation)

KV: kvercetin

LDL: lipoproteini nizke gostote (low density lipoprotein)

MF: mobilna faza

Mr: relativna molekulska masa

oQ10: oksidirana oblika koencima Q10 = sinonim za CoQ10

RDA: priporočen dnevni vnos (recommended daily administration)

rQ10: reducirana oblika koencima Q10

RSD: relativni standardni odklon

ROS: reaktivne kisikove spojine

SD: standardni odklon

T: temperatura

THF: tetrahidrofuran

t_r : retencijski čas

VLDL: lipoproteini zelo nizke gostote (very low density lipoprotein)

1 UVOD

1.1 PREHRANSKA DOPOLNILA

Prehranska dopolnila so opredeljena kot izdelki, ki vsebujejo prehransko in fiziološko pomembne sestavine živil v koncentrirani obliki. Kot navaja pravilnik o prehranskih dopolnilih, se uvrščajo med živila z namenom dopolniti prehrano. Oblikovana so v različnih farmacevtskih oblikah tako, da jih je mogoče uživati v odmerjenih količinskih enotah. Najpogosteje jih najdemo v obliki kapsul, tablet, redkeje kot pastile, granule. Prehranska dopolnila lahko prav tako vsebujejo maščobne kisline, vlaknine, rastline in rastlinske izvlečke, mikroorganizme, vendar le če je njihova varnost uporabe dokazana (1). Dovoljena je uporaba zdravilnih rastlin, ki so uvrščene v kategorijo H (hrana), vendar pa se izdelkom ne sme pripisovati zdravilnih učinkov pri ljudeh (2).

Pravilnik o prehranskih dopolnilih navaja zahteve glede označevanja. Ovojnina mora vsebovati naslednje oznake: 1) *navedba prehransko dopolnilo ob imenu izdelka*, 2) imena vrste hranil ali snovi, ki so značilne za prehransko dopolnilo ali podatek o naravi hranil ali snovi, 3) priporočena dnevna količina oziroma odmerek, 4) *navedba: Prehransko dopolnilo ni nadomestilo za uravnoteženo in raznovrstno prehrano*, 5) *opozorili: Shranjevati nedosegljivo otrokom, Priporočene dnevne količine oziroma odmerka se ne sme prekoračiti*.

Izdelek mora vsebovati oznako o količini posameznih hranil, medtem ko je količino vitaminov in mineralov potrebno podati kot odstotek priporočenega dnevnega vnosa (RDA, recommended daily administration) (1). Pravilnik o splošnem označevanju predpakiranih živil, kar velja tudi za prehranska dopolnila predpisuje, da morajo biti oznake jasne, razumljive, na opaznem mestu ovojnine. Prepovedano je zavajanje potrošnika glede lastnosti, izvora, količine in sestave kot tudi navajanje zdravilnih lastnosti v smislu preprečevanja, zdravljenja in ozdravljenja bolezni ljudi (3). Kadar proizvajalec daje prvič na tržišče prehransko dopolnilo mora o tem obvestiti ministrstvo za zdravje ter posredovati izvirno ovojnino. Ministrstvo za zdravje lahko od proizvajalca zahteva dodatno strokovno dokumentacijo (znanstveno študijo), ki potrdi, da gre za prehransko dopolnilo (1).

Vloga za postopek prve prijave prehranskega dopolnila mora vsebovati: 1) spremni dopis, 2) izvorno označbo, če izdelek ni proizveden v Republiki Sloveniji ali proizvodno specifikacijo, če je proizveden v Republiki Sloveniji, 3) potrdilo drugega pristojnega organa, da gre za prehransko dopolnilo, če ni proizvedeno v Republiki Sloveniji, 4) dokazilo o plačilu upravne takse, 5) 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.

Ministrstvo za zdravje na podlagi prve prijave izda sklep in na svoji spletni strani dopolni seznam prehranskih dopolnil. Lahko zahteva tudi dodatno strokovno dokumentacijo o prehranskem dopolnilu. Minister za zdravje lahko začasno prepove ali omeji promet s prehranskimi dopolnili, kadar obstaja utemeljen sum, da je izdelek nevaren za zdravje ljudi (1,4). Primerne nadzora nad kakovostjo prehranskih dopolnil ni, saj pravilnik ne zahteva kontrole kakovosti. Vso odgovornost nad izdelkom nosi nosilec živilske dejavnosti. Zdravstveni inšpektorat Republike Slovenije preverja odsotnost nevarnih primesi z rednimi vzorčenji; testirajo prisotnost težkih kovin in policikličnih aromatskih ogljikovodikov (5).

V zadnjem času je na tržišču čedalje več prehranskih dopolnil, ki pa se po zgledu bistveno ne razlikujejo od zdravil, zato potrošniki težko ločijo med njima. Obstaja velika razlika med zdravili in prehranskimi dopolnili, saj morajo zdravila pred prihodom na tržišče pridobiti dovoljenje za promet in imajo dokazano varnost, učinkovitost in preverjeno kakovost. Zakon o zdravilih pa navaja, da je zdravilo vsaka 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 uporablja pri ljudeh ali živalih z namenom, da bi se ponovno vzpostavile, spremenile ali izboljšale fiziološke funkcije prek farmakološkega, imunološkega ali presnovnega delovanja ali da bi se postavila diagnoza. Zdravila so izdelana pod strogimi pravili dobre proizvodne prakse (GMP, good manufacturing practice) in so pod stalnim nadzorom inšpekcijskih služb. Preden je zdravilo dano v promet, mora biti v skladu z načeli dobrih proizvodnih praks analizo, neklinično farmakološko-toksikološko in klinično preizkušeno, da se pridobi ocena o njegovi kakovosti, varnosti in učinkovitosti. Vse informacije o področju uporabe, opozorilih, učinkovitosti, previdnostnih ukrepih, kontraindikacijah, interakcijah in neželenih učinkih so verodostojne (6).

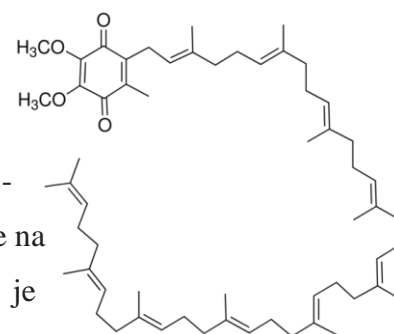
1.2 POMEMBNEJŠI ANTIOKSIDANTI V PREHRANSKIH DOPOLNILIH

Vloga antioksidanta je upočasniti, preprečiti ali odstraniti oksidativno poškodbo tarčne molekule (DNA, proteini, celične membrane). Tipični predstavniki so nekateri vitamini, kot npr. vitamin C in E, ki imata neposredne učinke kot lovilca in odstranjevalca reaktivnih kisikovih spojin. Preko različnih mehanizmov vplivata tudi na oksidativni stres. Antioksidante razdelimo glede na učinkovitost in zastopanost v organizmu. Najučinkovitejši so endogeni antioksidanti (encimi) npr. *superoksid dismutaze*, *katalaze*, *peroksidaze*. Naslednji po učinkovitosti so na voljo v krvi in tkivih v visoki koncentraciji npr. *albumin*, *sečna kislina*. V tretjo skupino spadajo esencialni antioksidanti (vitamini, mikroelementi in elementi v sledovih ter aminokislina) in spojine, ki jih telo tvori kot intermediate pri sintezi bolj kompleksnih spojin (skvalen pri sintezi holesterola). Najštevilčnejša skupina pa predstavlja spojine naravnega izvora, kot so karotenoidi (okoli 600) in flavonoidi/polifenoli (okoli 1600). Glede na fizikalno kemijske lastnosti pa antioksidante delimo na lipofilne, te najdemo zlasti v celičnih membranah in lipoproteinih (vitamin E, CoQ10), hidrofilni se nahajajo v vodnih sredinah (B vitamin, vitamin C) ter amfifilni, ki so topni tako v vodi kot v maščobah (glutation, lipojska kislina). Organizem lahko antioksidante regenerira (vitamina C, E, glutation, CoQ10) ali pa jih porablja brez možnosti obnove (likopen). Endogena sinteza nekaterih antioksidantov se s starostjo zmanjšuje (npr. CoQ10), zato postanejo pomembnejši eksogeni viri (7).

Na tržišču so številni izdelki z antioksidativnim delovanjem, ki vsebujejo enega ali več antioksidantov. Med lipidotopnimi antioksidanti endogenega izvora je pomemben CoQ10 in tako je pogosto zastopana kombinacija CoQ10, vitamina C in E v prehranskih dopolnilih. Med flavonoidi je najbolj poznan kvercetin. Zraven naštetih je bila v diplomski nalogi predmet obravnave tudi elagična kislina kot predstavnica elagotaninov.

1.2.1 KOENCIM Q 10

Koencimi Q10 so lipofilne molekule, ki so naravno prisotne v vsaki živi celici, zaradi njihove velike razširjenosti v naravi, pa jih imenujemo tudi ubikinoni. Kemijsko gre za 2,3-dimetoksi-5-metil-6-poliizoprenil-1,4-benzokinone, ki jih poimenujemo glede na dolžino poliizoprenske verige. Stranska veriga koencima Q10, je



Slika 1: Struktura CoQ10

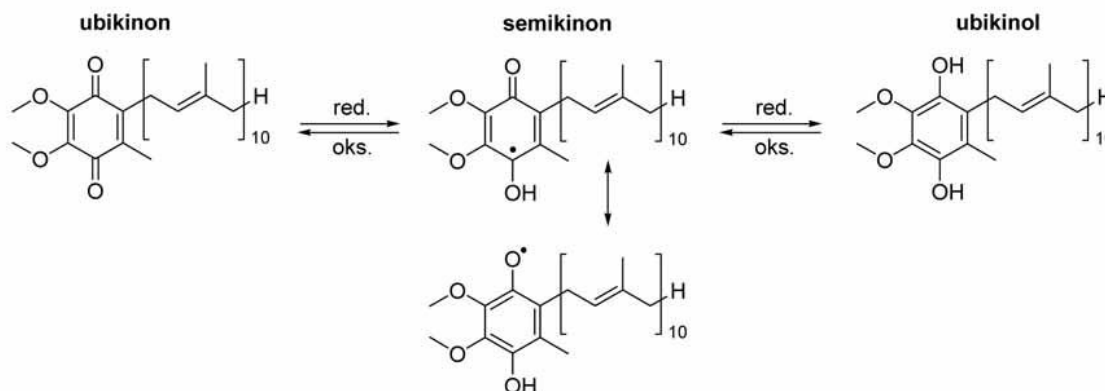
tako sestavljena iz 10 izoprenskih enot (Slika 1). Spojine s 6-9 izoprenskimi enotami najdemo pri živalih, koencim Q 10 (CoQ10) pa je značilen le za človeka. Sinonim za to spojino je ubidekarenon (8).

Koencim Q10 je amfifilna redoks-aktivna molekula, vendar ima zaradi dolge nepolarne stranske verige lipofilen značaj. CoQ10 je naravna molekula z lastnostmi podobnimi vitaminom. Po strukturi je sorodna vitaminu K, vendar je zaradi endogene sinteze ne uvrščamo med vitamine. Ima pomembno vlogo pri pridobivanju celične energije, saj sodeluje kot kofaktor pri prenosu elektronov v procesu celičnega dihanja v mitohondrijih. Udeležen je tudi pri celičnem signaliziranju in izražanju nekaterih genov (8). Posledično se nahaja v telesu le v treh oblikah: micelni agregati, vezan na lipidne membrane in na proteine. CoQ10 je mobilna molekula in je predvsem prisoten v področjih, ki so fizično ločena od verig lipidnega dvosloja, kar pomeni, da pri transportu elektronov v celici sodeluje le manjši del molekul CoQ10. Največji delež je v membranah mitohondrijev, v citosolu pa je le približno 10% celotnega koencima (8).

1.2.1.1 Mehanizem delovanja

Za biološko funkcijo je pomembno redoks ravnotežje med popolnoma oksidirano ubikinonsko obliko, semikinonsko in reducirano ubikinolno obliko, pri čemer redoks potencial ubikinon/ubikinol znaša 0,1 V. Prehajanje med oblikami je prikazano na sliki 2. CoQ10 je koencim različnim membranskim encimom, vendar je najboljše raziskana njegova ključna vloga v kompleksih mitohondrijske dihalne verige: NADH-CoQ10 reduktazi (kompleksu I), sukcinat-CoQ10 reduktazi (kompleksu II) in ubikinol-citokrom c reduktazi (kompleks III). Ima zelo pomembno vlogo prenašalca elektronov med navedenimi kompleksi in tako sodeluje pri nastajanju membranskega gradienta protonov, potrebnega za delovanje ATP sintaze. Za redukcijo ubikinona v ubikinol sta poleg dveh elektronov potrebna tudi dva protona. Gradient protonov je potreben pri prehajanju protonov nazaj v notranjost mitohondrija, saj poganja encimske komplekse, pri čemer nastaja ATP, ki predstavlja vir energije za mišice in celične funkcije (8,9). Proces oksidativne fosforilacije (predvsem kompleksa I in II) predstavljajo največji izvor reaktivnih kisikovih spojin, kot so radikali in peroksidi. Ti povzročajo ireverzibilne poškodbe na bioloških molekulah. CoQ10 je ključna sestavina telesnega obrambnega mehanizma proti reaktivnim kisikovim spojinam, kajti deluje antioksidativno v reducirani obliki (ubikinol). Ta predstavlja več kot 80% celotnega CoQ10 v plazmi in velja za

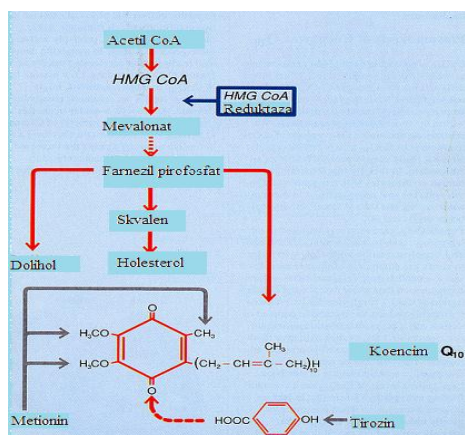
edinega endogenega lipidotopnega antioksidanta. Ubikinol zavira oksidacijo lipidov in proteinov v celičnih membranah ter fazo iniciacije lipidne peroksidacije in tako prepreči oksidativne poškodbe DNA in ostalih bioloških makromolekul. Prav tako deluje kot stabilizator celičnih membran. Ubikinol deluje antioksidativno na dva načina: neposredno reagira s prostimi radikali ali pa regenerira aktivno obliko vitamina E, tako da reducira α -tokoferol radikal (10,11).



Slika 2: Redoks stanja CoQ10 (8)

1.2.1.2 Biosinteza

V procesu biosinteze CoQ10 je pomemben encim hidrosimetilglutaril (HMG)-CoA reduktaza, ki je udeležena tudi pri sintezi holesterola. Proces zajema tri glavne stopnje, ki so prikazane na Sliki 3: sinteza benzokinona poteče iz aminokislin tirozina ali fenilalanina. Izoprenska stranska veriga nastane iz acetilkoencima (CoA) preko mevalonatne poti, na koncu sledi kondenzacija ali združenje benzokinona z izoprensko stransko verigo (10).



Slika 3: Prikaz biosinteze CoQ10 in holesterola (10)

1.2.1.3 Viri CoQ10 in pomanjkanje

V človeškem telesu je povprečno 2 g CoQ10 in organizem ga dnevno nadomesti okrog 0,5 g predvsem z endogeno sintezo, deloma pa s hrano. Največ ga je v metabolno najaktivnejših organih, kot so srce, jetra, ledvica, trebušna slinavka. Znotraj celice ga je največ v mitohondrijih, Golgijevem aparatu, lizosomih, prisoten pa je tudi v membranah celic. Učinkovitost sinteze s starostjo upada npr. v srcu se začne nižati koncentracija že po 20. letu in se do 80. leta zniža za 60%. Pomanjkanje so opazili pri uživalcih statinov, kadilcih, pri različnih bolezenskih stanjih in pri ljudeh z neuravnoteženo prehrano. Tako postaja vse pomembnejši eksogeni vnos CoQ10, vendar pa je v hrani njegova vsebnost nizka. Med najboljše vire spadajo rdeče meso-govedina (40 mg/kg), sardine (64 mg/kg), oreščki-arašidi (27 mg/kg), olivno olje (160 mg/kg). S predelavo živil se vsebnost CoQ10 zmanjšuje, zato so precejšnje razlike v vsebnosti glede na pridelavo in tehnološko obdelavo hrane. Če povečanim potrebam po CoQ10 ne moremo zadostiti z običajno prehrano, dnevni vnos koencima lahko povečamo s funkcionalnimi živili, ki so obogaten s koencimom in prehranskimi dopolnili. V Sloveniji je CoQ10 na tržišču predvsem v obliki prehranskih dopolnil, le izdelek Fidi Koencim 10[®] je registriran kot zdravilo. Na voljo je veliko oblik CoQ10 v prehranskih dopolnilih, ki se razlikujejo po absorpciji in biološki uporabnosti (Preglednica I) (8,12).

Preglednica I : Nekateri izdelki s CoQ10 dosegljivi v Sloveniji kot zdravila brez recepta ali prehranska dopolnila

<i>Razred</i>	<i>Oblika</i>	<i>Izdelek</i>	<i>Vsebnost CoQ10</i>	<i>Vsebnost AK</i>	<i>Vsebnost vitamina E</i>
<i>A</i>	<i>trde kapsule</i>	<i>Sensilab Koencim Q10 (Farmicon)</i>	<i>50 mg/ kap.</i>	<i>/</i>	<i>/</i>
<i>B</i>	<i>mehke kapsule</i>	<i>Natural Wealth Koencim Q10(Difar)</i>	<i>30 mg/ kap.</i>	<i>40 mg/kap.</i>	<i>24 mg/ kap.</i>
<i>C</i>	<i>mehke kapsule</i>	<i>Pharma Nord Bio-Qinone[®] Q10 (Mic Mengeš)</i>	<i>30 mg /kap.</i>	<i>/</i>	<i>/</i>
<i>D</i>	<i>mehke kapsule</i>	<i>NOW Ubiquinol CoQHCF[®](Bimedia)</i>	<i>50 mg /kap</i>	<i>/</i>	<i>/</i>
<i>E</i>	<i>tablete</i>	<i>Quvital tablete[®](Novval)</i>	<i>30 mg/ tab.</i>	<i>/</i>	<i>/</i>

Na podlagi podatkov o njihovi biološki uporabnosti so izdelki razdeljeni v pet razredov:

A: izdelki s kristalnim CoQ10, za katerega je značilna slaba absorpcija

B: izdelki z oljno suspenzijo ubikinona, katere biološka uporabnost ni bila preverjena, verjetno je boljša od kristalnega CoQ10 (dodani so emulgatorji: lecitin, polisorbitat 80 za izboljšanje absorpcije)

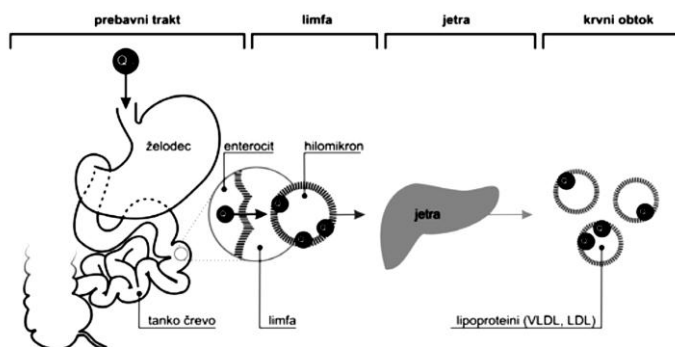
C: izdelki z oljno suspenzijo ubikinona, katerih biološka uporabnost je dokazano boljša od kristalnega CoQ10 (dodani so emulgatorji: lecitin, polisorbitat 80 za izboljšanje absorpcije)

D: izdelki z oljno suspenzijo ubikinola, katere biološka uporabnost je verjetno boljša od kristalnega CoQ10 (predvideva se boljša biološka uporabnost ubikinola, ni pa še bila izvedena primerjava biološke uporabnosti z oljnimi suspenzijami ubikinona)

E: izdelki z vodotopno obliko CoQ10, katere biološka uporabnost je dokazano boljša od oljne suspenzije ubikinona (ubikinon je vgrajen v β -ciklodekstrine) (8)

1.2.1.4 Absorpcija in metabolizem

Koencim Q10 ima precej veliko molekulsko maso ($M_r = 863 \text{ g/mol}$) in je zaradi kemijske zgradbe netopen v vodi, hkrati pa je omejena tudi njegova topnost v lipidih. Iz prebavnega trakta se slabo absorbira, vendar lahko dosežemo večjo absorpcijo s sočasnim uživanjem hrane in delitvijo odmerka



na več manjših. Študije na glodalcih so pokazale le 2-3% absorpcijo

Slika 4: Shematski prikaz absorpcije in transporta CoQ10 (8)

CoQ10, pri ljudeh pa je nekoliko višja, nekje do 10%.

Tako α -tokoferol kot tudi CoQ10 sta podobni lipofilni molekuli in se tudi mehanizem absorpcije bistveno ne razlikuje. Temelji na emulzifikaciji s pomočjo encimov trebušne slinavke in žolča v tankem črevesu. Pri tem nastanejo micelni agregati, ki so pomembni za absorpcijo maščob. Identificirano ni nobeno specifično mesto za absorpcijo CoQ10 vzdolž

tankega črevesa. CoQ10 se vgradi v hilomikrone, ki se po procesu absorpcije in transporta preko membrane enterocitov prenesejo v limfo, nato pa v krvni obtok. Študije izvedene na podganah kažejo, da se CoQ10 reducira tekom absorpcije v enterocitih in je v krvi pretežno v reducirani obliki. Ubikinol se pojavi kot del mezenteričnih lipoproteinov, ki vsebujejo triacilglicerole. Ti lipoproteini se z encimom lipoprotein lipazo pretvorijo do hilomikronskih ostankov, ki se v jetrih spremenijo v VLDL/LDL lipoproteine ter se nato sprostijo v krvni obtok. HDL lipoproteini prav tako vsebujejo majhne količine CoQ10.

Metabolizem še ni povsem raziskan, kot kažejo študije na živalih se CoQ10 metabolizira v vseh tkivih, izloča pa se predvsem z blatom. V študiji izvedeni na prašičih so opazovali metabolizem CoQ10. Izmerili so, da se je 4,8% CoQ10 pojavilo v žolču. Po reabsorpciji po 48 urah se je v urinu pojavilo 8,3% CoQ10, ki je bil v obliki konjugiranih glukoronidov. Maksimalna koncentracija v plazmi je dosežena v 2-6 urah po zaužitju. Po prenehanju jemanja se plazemska koncentracija povrne na izhodiščno v nekaj dneh. Farmakokinetične študije kažejo, da zunanji vnos koencima ne vpliva na endogeno sintezo. Po prenehanju jemanja prehranskih dopolnil se CoQ10 ne akumulira v tkivih ali plazmi (8, 14).

1.2.1.5 Varnost odmerjanja

Po tridesetih letih uporabe CoQ10 kot prehranskega dopolnila niso zabeležili resnih neželenih učinkov. V literaturi ni poročil o pomembnih stranskih učinkih pri zaužitju CoQ10 v odmerku do 1200 mg/dan pri zdravih preiskovancih. Prav tako pri tistih, ki so prejeli CoQ10 v odmerku 300, 600, 900 mg/dan 4 tedne. Ocena tveganja po metodi opaženih varnih vrednosti (OSL, observed safety level) je pokazala varnost dnevnih odmerkov do 1200 mg. Zelo redko se pojavijo simptomi v prebavilih kot so: slabost, driska, zmanjšanje teka, bruhanje in občutki nelagodja v trebuhu. Opisovali so tudi glavobol, srbenje kože, izpuščaj, nespečnost in razdražljivost. Omenjene učinke se da omiliti tako, da se odmerki, višji od 100 mg, razdelijo na dva ali tri manjše dnevne odmerke. Priporočen dnevni odmerek za CoQ10 ni določen zaradi endogenega izvora in različnih potreb posameznikov pri različnih bolezenskih stanjih. V Sloveniji je trenutno dovoljen dnevni odmerek do 50 mg, kar je nizko v primerjavi z drugimi evropskimi državami (npr. v Belgiji 200 mg). Velikost odmerka je odvisna tudi od namena uporabe (preventiva, različna bolezenska stanja in oblika formulacije) (10,11).

1.2.1.6 Interakcija z zdravili

CoQ10 lahko zmanjša učinkovitost varfarina, zdravila, ki vpliva na strjevanje krvi, saj je strukturno podoben vitaminu K. Varfarin deluje kot antagonist vitamina K in preprečuje sintezo nekaterih faktorjev strjevanja krvi. Navedenih je le nekaj poročil o primerih bolnikov, kjer so opazili interakcijo med varfarinom in CoQ10. Zdravniki odsvetujejo pacientom, ki prejemajo antikoagulantno terapijo, sočasno jemanje izdelkov s CoQ10, sicer je potrebno nadzorovati čas strjevanja krvi (10,13). Pri bolnikih, ki so na terapiji s statini lahko pride do pomanjkanja CoQ10, saj ti preko zaviranja encima HMG-CoA reductaze, udeleženega tudi pri sintezi holesterola, vplivajo na sintezo CoQ10. Bolnikom, ki uživajo statine, priporočajo, naj dodatno uživajo CoQ10, kajti s tem preprečijo s statini povzročeno miopatijo. Priporočeni odmerek v času statinskega zdravljenja je med 30 in 250 mg/dan. Prav tako lahko nekatera zdravila vplivajo na znižanje CoQ10, tako da zavirajo encime v procesu njegove biosinteze: hidralazin, tiazidi, propranolol, metildopa, haloperidol, triciklični antidepresivi (10). Absolutne kontraindikacije uporabe CoQ10 niso znane. Pri otrocih, nosečnicah in doječih materah se pred jemanjem svetuje posvet z zdravnikom (10,11).

1.2.1.7 Klinična raba

- *nevrodegenerativne bolezni*

Študije so pokazale, da ima CoQ 10 ugoden vpliv pri različnih bolezenskih stanjih, največ raziskav pa je namenjenih učinku CoQ10 v višjih odmerkih za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni. Zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni, kot so Alzheimerjeva, Huntingtonova in Parkinsonova bolezen, je osnovano na terapiji z antioksidanti, saj je vzrok teh bolezni povečan oksidativni stres v možganih, kar privede do poškodb. Osnovni vzrok Parkinsonove bolezni je degeneracija delovanja mitohondrijev dopaminergičnih nevronov v bazalnih ganglijah. Ugotovili so, da zdravljenje s CoQ10 v visokih odmerkih vpliva na upočasnitev bolezni, vendar pa bodo potrebne nadaljnje raziskave, da bi z gotovostjo potrdili omenjeni učinek (10). Pri bolnikih z začetno obliko Huntingtonove bolezni, ki so sočasno z običajnim odmerkom remacemida 600 mg/dan prejemali 300 mg CoQ10 in po 30 mesečnem opazovanju niso opazili pomembne upočasnitve upada celotne funkcionalne zmogljivosti (10,15). Med nevrodegenerativne bolezni spada tudi Alzheimerjeva bolezen, čeprav še ni bilo izvedenih kliničnih študij, kjer bi proučevali vpliv CoQ10 na potek bolezni (15).

- *bolezni srca*

CoQ10 se v velikem deležu nahaja v miokardiju in je potreben za normalno srčno funkcijo, zato so bolezni srca med glavnimi terapevtskimi področji uporabe CoQ10. Precej kliničnih študij je pokazalo, da CoQ10 izboljša srčno funkcijo in fizično zmogljivost. Zmanjša tudi tveganje za nastanek srčno-žilnih bolezni, saj skupaj z vitaminom E prepreči oksidacijo LDL, ki je glavni aterogeni dejavnik (16). Pri bolnikih po akutnem srčnem infarktu, ki so prejeli CoQ10, so ugotovili zmanjšano število smrti, nenadnih motenj srčnega ritma in ponovnih srčnih infarktov. Jemanje CoQ10 pred srčno operacijo in po njej ugodno vpliva na delovanje srca, zmanjša število zapletov in skrajša čas pooperativnega okrevanja. CoQ10 nima klinično pomembnih neželenih učinkov, zato domnevajo, da je varen dodatek k standardnim oblikam zdravljenja srčno-žilnih bolezni (10).

- *ateroskleroza*

Je najbolj razširjena žilna bolezen in spada med najpomembnejše vzroke obolevnosti in smrtnosti v razvitem svetu. Študija, kjer so preiskovanci z blago dislipidemijo in diabetesom tipa II jemali 200 mg CoQ10, je pokazala izboljšanje endotelijske funkcije v arterijah perifernega obtoka (15). Pri bolnikih s kronično stabilno angino pectoris, ki so poleg rednega zdravljenja prejeli tudi CoQ10 v odmerku 60 do 600 mg/dan, so ugotovili izboljšano toleranco za napor ter manjše ali zakasnjene elektrokardiografske spremembe, ki so nastale kot posledica ishemije miokarda (10,17).

- *statinska miopatija*

Veliki odmerki statinov znižajo koncentracijo CoQ10 v mišicah, zmanjšajo aktivnost dihalne verige v mitohondrijih, kar posledično lahko zmanjša število mitohondrijev v mišičnih celicah. Klinično se to izraža v obliki miopatij. To lahko preprečimo z dodajanjem CoQ10 v obliki prehranskih dopolnil brez vpliva na znižanje koncentracije plazemskega holesterola (10,18).

- *hipertenzija*

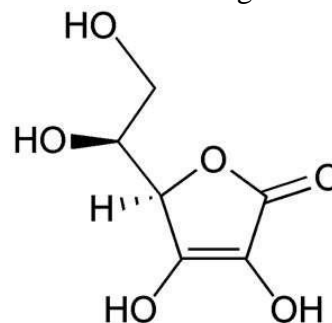
Rezultati študij so pokazali, da CoQ10 zniža sistolični tlak za 17 mmHg in diastolični za 10 mmHg. Učinek je najverjetneje povezan z izboljšanjem endotelijske funkcije v steni krvnih žil. Dokazali so tudi učinek CoQ10 na izboljšanje diastolične disfunkcije, kjer so k standardni terapiji dodajali 200 mg CoQ10 (18).

- migrena

Ugoden antioksidativni vpliv CoQ10 so dokazali tudi pri zdravljenju migrene, pri kateri imajo veliko vlogo vnetni dejavniki. Ti lahko povzročijo nastanek reaktivnih kisikovih spojin, kar zmanjša koncentracijo CoQ10. V profilaksi migrene so poročali o pozitivnih učinkih dodatkov s CoQ10 (18).

1.2.2 VITAMIN C

Askorbinska kislina (vitamin C) je pomemben vodotopni antioksidant in encimski kofaktor pri rastlinah in živalih, ki so ga sposobni sintetizirati tudi sami. Človek ga zaradi pomanjkanja encima gulonolakton oksidaze, ki katalizira zadnjo stopnjo v biosintezni poti, ne more proizvesti sam, zato je nujno potreben vnos s hrano. Askorbinsko kislino zato uvrščamo med vitamine (19). Vitamin C je potreben za sintezo kolagena, ki je pomembna sestavina krvnih žil in



Slika 5: Vitamin C

ligamentov. Igra pomembno vlogo v sintezi neurotransmitterja- noradrenalina, kot tudi v sintezi karnitina, ki prenaša maščobne kisline v mitohondrije. Raziskave kažejo, da je udeležen pri metabolizmu holesterola do žolčnih kislin, kar vpliva na koncentracijo holesterola in incidenco žolčnih kamnov. Ima visoko antioksidativno delovanje in že v majhnih količinah lahko zaščitijo esencialne molekule, kot so proteini, lipidi, nukleinske kisline pred škodljivim delovanjem prostih radikalov. Vitamin C lahko regenerira ostale antioksidante, kot je vitamin E. Študija izvedena na kadilcih je pokazala, da lahko vitamin C pretvori vitamin E iz oksidirane oblike nazaj v reducirano (20).

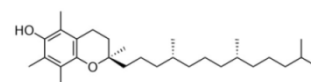
Trenutno je priporočen dnevni odmerek (RDA, recommended daily administration) za zdrave odrasle osebe 100 mg. Odmerek 400 mg/dan je priporočljiv za starejše osebe s kroničnimi boleznimi; še posebej pri tistih, katerih nastanek je povezan z oksidativnimi poškodbami: srčne bolezni, katarakta, določene vrste raka. Vitamin C se zaradi njegove farmakokinetike ne akumulira v toksičnih koncentracijah. Prevelik vnos se uravna z zmanjšano absorpcijo in povečano eliminacijo v urin. Nastanejo lahko presnovni produkti npr. urat in oksalat kot rezultat povečanega vnosa, zato priporočajo, da naj ne bi dnevni odmerki presegli 1000 mg. Pri ljudeh s hiperoksalemijo so lahko visoki odmerki škodljivi. Vitamin C poveča absorpcijo železa, tako da prepreči njegovo oksidacijo do Fe^{3+} , zato je

potrebna pazljivost pri osebah s povečano koncentracijo železa, hemokromatozo in sideroblastno anemijo, saj so lahko preveliki vnosi nevarni. V previsokih odmerkih lahko deluje prooksidativno. Posledice pomanjkanja vitamina C, ki lahko vodi do skorbuta, so poznali že v 18. stoletju. Značilni simptomi so krvavenje dlesni, izguba las in zob, bolečine v sklepih, otekanje zaradi zmanjšane sinteze kolagena. Danes se v razvitih državah skorbut redko pojavi, saj že dnevni vnos 10 mg vitamina C prepreči njegov nastanek (20).

Rezultati številnih študij kažejo, da je nizek vnos vitamina C povezan s povečanim tveganjem za srčno-žilne bolezni in že dnevni vnos 100 mg je zadostoval za znižanje incidence med nekadilci. Meta analiza študij, ki so proučevale vpliv vitamina C na preprečevanje prehlada je pokazala, da tudi vnos do 2 g/dan ni znižal incidence prehlada, vendar pri posameznikih, ki so izpostavljeni stresu, hladnemu vremenu, fizičnim obremenitvam lahko izkazuje terapevtsko korist. Prehranska dopolnila z vitaminom C in še nekaterimi antioksidanti so dokazano upočasnila razvoj starostne degeneracije rumene pege in poslabšanje vida. Učinkovitost vitamina C za zdravljenje diabetične retinopatije so že proučevali, vendar so še potrebne nadaljnje študije za potrditev delovanja (19,20).

1.2.3 VITAMIN E

Naravna oblika vitamina E oz. α -tokoferola je RRR- α -tokoferol, kar pomeni da je na vseh treh kiralnih ogljikovih atomih R konfiguracija, in sicer na mestu 2,4 in 8'. Za biološki učinek je potrebna R konfiguracija na 2. mestu, medtem ko je sintetična oblika racemat in je mešanica osmih različnih stereozomerov, ki se razlikujejo v konfiguraciji stranske verige. Pomembna razlika je pri uporabi sintetične in naravne oblike α -tokoferola, saj je plazemska



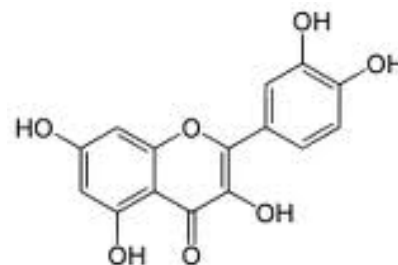
Slika 6: Vitamin E

koncentracija za 50% nižja pri sintetični obliki vitamina E. Vitamin E je topen v maščobah, po telesu se prenaša z lipoproteini. Metabolizem lipidov in lipoproteinov je odgovoren za prenos vitamina E iz jeter v krvni obtok in nato do tkiv. Plazemske koncentracije α -tokoferola so regulirane preko jeter s pomočjo specifičnega α -tokoferol transportnega proteina (α -TTP), ki prenaša vitamin E iz jeter v plazmo. Absorbira se po enaki poti kot npr. holesterol in trigliceridi. Vitamin E spada med najpomembnejše lipidotopne antioksidante in je pomembno hranilo za preprečevanje periferne nevropatije in hemolitične anemije. Nahaja se v lipidotopnih delih celice, kot je fosfolipidna membrana (21). Vitamin E pa ima poleg antioksidativnega delovanja še druge pomembne biološke

funkcije: udeležen je pri prenosu signalov, deluje kot inhibitor protein kinaze C, ki je kot izoencim udeležena pri signaliziranju, vpliva na adhezijo in agregacijo trombocitov v kaskadi strjevanja krvi ter modelira funkcijo fosfolipaze A in produkcijo prostaciklina, metabolita arahidonske kisline (22). Pri premajhnem vnosu začne njegova koncentracija v plazmi upadati šele po nekaj mesecih. Priporočen dnevni vnos je 15 mg α -tokoferola. Toksičnost vitamina E je sorazmerno majhna, saj se za razliko od ostalih lipidotopnih vitaminov ne kopiči v jetrih. Zelo veliki odmerki (nad 800 mg) lahko povzročijo mišično oslabelost, utrujenost in drisko. Odmerki nad 1000 mg nasprotujejo delovanju vitamina K, to pa lahko pripelje do krvavitev. Simptomi pomanjkanja kažejo, da imajo njegove antioksidativne lastnosti pomembno vlogo pri zaščiti membran in živčnega sistema pred oksidativnim stresom. Najpomembnejša posledica pomanjkanja se klinično izraža kot periferna nevropatija z degeneracijo aksonov v senzornih nevronih. Prav tako vpliva na imunski sistem, odkrili so, da je pomemben za normalno delovanje T-limfocitov. Izvedene so bile številne epidemiološke študije, čeprav so bile nekatere kratkotrajne, ki so pokazale, da vitamin E zniža tveganje za nastanek srčno-žilno bolezni, nekaterih oblik raka, katarakte, zapletov zaradi sladkorne bolezni in nevroloških bolezni (23-25).

1.2.4 KVERCETIN

Flavonoidi so široka skupina fenolnih spojin, ki se nahajajo v rastlinah pretežno v obliki glikozidov, ki imajo vezanih več različnih monosaharidov v kombinaciji z di- in trisaharidi. Najpogosteje se med sladkorji pojavljata d-glukoza in l-ramnoza. Pretežno so v obliki O-glikozidov,



Slika 7: Kvercetin

pri čemer je sladkorna veriga pripeta preko hidroksilne skupine na položaju C-3 ali C-7 (26). Kvercetin spada med flavone in je najbolj pogost med flavonoidi v rastlinski hrani. Najdemo ga v zelenem čaju, jabolkih, gozdnih sadežih, čebuli, paradižniku (27).

Vsebujejo ga tudi zdravilne rastline *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum* in *Sambucus canadensis*. Kvercetin se pretežno nahaja v hrani v obliki glikozida, pri čemer se pri prebavi glikozilne skupine sprostijo. Encimi v ustih ga hidrolizirajo do aglikona. Študije so pokazale, da ima kvercetin v obliki glikozida veliko boljšo biološko uporabnost kot v obliki aglikona.

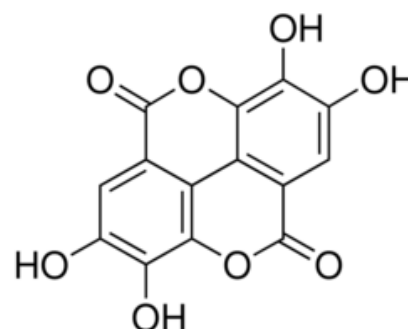
Kvercetin kot antioksidant ima številne pozitivne učinke na zdravje; znižuje krvni tlak, ima antikarcenogeno delovanje. Študije izvedene na živalih nakazujejo zaščitno delovanje kvercetina pred poškodbami z reaktivnimi kisikovimi spojinami in dejavniki oksidativnega stresa na tkivo možganov in srca. Znižan vnos flavonoidov kot tudi kvercetin povezujejo s povečanim tveganjem za srčno-žilne bolezni, saj zavira agregacijo trombocitov in tvorbo trombov (27).

Raziskave na podganah so pokazale, da kvercetin znižuje koncentracijo glukoze v plazmi, normalizira glukozne tolerančne teste, ohranja funkcijo pankreatičnih β -celic. Ugodno deluje tudi na nevropatsko bolečino in diabetično nevropatijo. Številne *in vitro* in *in vivo* raziskave na živalih so pokazale učinek kvercetina na rakavo tkivo. *In vitro* modeli kažejo, da kvercetin deluje po več mehanizmih, in sicer antiproliferativno, antioksidativno, spodbuja celično smrt, zavira celične signalne poti in rastne faktorje udeležene pri rasti tumorskega tkiva in ima sinergistično delovanje z nekaterimi kemoterapevtiki (27).

1.2.5 ELAGIČNA KISLINA

Elagotanini so polifenoli, ki se nahajajo v nekaterih vrstah sadja in oreščkov npr. robidah, malinah, granatnih jabolkah, lešnikih. Spadajo med hidrolizirajoče tanine, ki vključujejo tako galotanine kot elagotanine. Med

elagotanine se uvrščajo tudi nekatere spojine, ki se *in vivo* ne hidrolizirajo npr. veskalagin. Sestavljeni so iz ene ali več molekul heksahidroksidifenola (HHDP), ki



Slika 8: Elagična kislina

so povezani z biarilno vezjo in zaestreni s sladkorjem, ponavadi z glukozo. Pri hidrolizi s kislinami ali bazami se molekule HHDP spontano premestijo v elagično kislino, ki je slabo vodotopna. Elagična kislina (EA) se metabolizira najprej v jejunumu, pri čemer nastanejo urolitini, ki se absorbirajo glede na lipofilnost. Zaradi prisotnosti metabolitov v urinu in žolču ter odsotnosti v črevesnih tkivih najverjetneje poteka absorpcija v želodcu. Epidemiološke raziskave kažejo, da vnos hrane bogate z elagotanini in elagično kislino, varuje pred številnimi kroničnimi boleznimi, čeprav rezultati *in vitro* eksperimentov pogosto ne sovpadajo z *in vivo* študijami. To je lahko posledica nizke biorazpoložljivosti EA in elagotaninov, saj urolitini niso tako močni antioksidanti kot elagotanini. Vendar pa urolitini izražajo estrogensko in anti-estrogensko delovanje. V študijah na tkivih miši so izmerili večje koncentracije urolitinov v prostati,

tankemu in debelemu črevesu, kar bi lahko pojasnilo zaviranje rasti rakavih celic v teh tkivih (28).

1.3 OKSIDACIJA

1.3.1 Splošno

Oksidacija je po definiciji oddajanje elektronov iz molekule, pri čemer se poveča oksidacijsko število, medtem ko se pri procesu redukcije zaradi sprejemanja elektronov oksidacijsko število zmanjša. V organskih molekulah oksidacija povzroči povečanje vsebnosti kisika ali zmanjšanje vsebnosti vodika. V oksidoredukcijskih sistemih potekata sočasno oksidacija in redukcija. Redoks reakcije vključujejo prenos enega ali več kisikovih ali vodikovih atomov ali pa prenos elektronov (29, 30). Za oksidacije je značilno, da jih sproži prisotnost oksidantov, svetlobe, kovinskih ionov, potekajo v vodnem in nevodnem okolju, tudi v trdni snovi. Odvisne so od koncentracije dejavnika, ki povzroči oksidacijo in posledično nastajajo toksični produkti, ki se strukturno bistveno razlikujejo. Nastanejo lahko različni intermedii, razpadni produkti z značilnimi organoleptičnimi spremembami vonja, okusa in izgleda. Oksidativne reakcije glede na pomen v stabilnosti delimo na redoks reakcije in avtooksidacije (31).

1.3.1.1 Redoks reakcije

Za redoks reakcije je značilen prehod elektronov brez vključevanja kisika v molekulo, pri čemer nastanejo reaktivni kationski ali anionski radikali. Potekajo v hidrofilnih sistemih. Občutljivost spojine za tovrstni tip reverzibilne oksidacije lahko predvidimo iz vrednosti standardnega redoks potenciala (E^0). Za vsako spojino v raztopini pri konstantni temperaturi velja, da je redoks potencial (E) odvisen od standardnega redoks potenciala, od števila elektronov, ki se prenesejo (n) in od logaritma kvocienta koncentracij reducirane [red.] in oksidirane [oks.] oblike, kot prikazuje enačba 1. Pri vseh reakcijah oksidacije, kjer so udeleženi vodikovi protoni ima na potek reakcije vpliv tudi pH. Z višanjem pH vrednosti se zniža redoks potencial. Pri nižjem redoks potencialu lažje poteka proces oksidacije, zato so spojine z visokim E^0 manj občutljive na proces oksidacije. V primeru raztopine askorbinske kisline in adrenalina, ki ima višji E^0 od askorbinske kisline, zato lahko ta zaščiti adrenalin pred oksidacijo (32).

$$E = E^0 - 0,059/n \times \log[\text{red.}] / [\text{oks.}] \quad \text{enačba 1: Nernstova enačba reakcije oksidacije}$$

1.3.1.2 Avtooksidacije

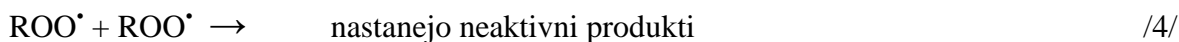
Oksidacije, ki potekajo spontano in pod vplivom reaktivnih spojin, imenujemo avtooksidacije. Avtooksidacija je ireverzibilna verižna reakcija, pri kateri se spojina počasi oksidira ob prisotnosti kisika in pod milimi pogoji, predvsem v lipofilnih sistemih kot tudi v bioloških sistemih, kjer se v procesu lipidne peroksidacije na enak način oksidirajo lipidi v celični membrani. V proizvodnji in shranjevanju farmacevtskih oblik je ta vrsta oksidacij pogostejša kot redoks reakcije. Verižna reakcija vključuje tvorbo radikalov in je sestavljena iz treh stopenj: iniciacije, propagacije in terminacije. V fazi iniciacije pod vplivom svetlobe, toplote, sledov kovinskih ionov nastajajo radikali (32).



Nastali radikali v fazi propagacije reagirajo s kisikom in tvorijo peroksi radikale (ROO^{\bullet}). Ti odvzamejo vodik organskim molekulam ali se vežejo na dvojne vezi, pri čemer nastanejo hidroperoksidi ($ROOH$) in novi radikali. Ti se lahko zopet vključujejo v reakcijo.



Hidroperoksidi so brez vonja in okusa in lahko razpadejo do aldehydov, ketonov in kratkoverižnih maščobnih kislin, ki imajo značilen neprijeten vonj. Propagacija se nadaljuje, dokler se ne porabi prisoten kisik ali organska molekula v sistemu. Najverjetneje nastopi prej faza terminacije, pri kateri zreagirajo med seboj radikali in tvorijo neaktivne produkte.



Med fazo iniciacije poteka oksidacija zelo počasi, zato je tudi imenovana indukcijska faza. Nato se v fazi propagacije hitrost oksidacije povečuje logaritemsko. V terminaciji se oksidacija upočasnjuje, dokler se ne ustavi (32).

1.3.2 Dejavniki vpliva na oksidacijo v farmacevtskih oblikah

Preprečevanje oksidacije v farmacevtskih oblikah je pomemben dejavnik ohranjanja stabilnosti učinkovin, ki so občutljive na oksidacijo, med procesom shranjevanja. Na proces oksidacije vpliva več parametrov, ki jih je potrebno upoštevati skozi celoten proces izdelave in shranjevanja farmacevtske oblike.

- *pH raztopine*

Pri mnogih učinkovinah je občutljivost za oksidacijo odvisna od pH raztopine. Kisle učinkovine npr. askorbinska kislina, fenoli, sulfhidrilne skupine se hitreje oksidirajo v nevtralnih in bazičnih pogojih. Za te učinkovine je najbolj optimalno pH območje 3-4, da se doseže najnižjo stopnjo oksidacij. pH vpliva na oksidacijo z neposrednim vplivom na redoks potencial oksidirajočih snovi. Višji kot je pH raztopine, nižji je redoks potencial in s tem večja občutljivost na oksidacijo (32,39).

- *prisotnost kisika*

Najhitreje potekajo oksidacije učinkovin v raztopinah in so odvisne od kisika, ki je raztopljen v mediju. Zaželeno je minimalna razgradnja, zato se za odstranjevanje kisika iz takih sistemov uporablja preprihovanje z inertnimi plini (dušik, argon), zapiranje s tesnimi zaporkami in preprečevanje vnosa zračnih mehurčkov. Reakcije oksidacije, ki potekajo v farmacevtskih izdelkih, so pogosto avtooksidacije, pri katerih je potreben kisik za fazo propagacije verižne reakcije. Stabilnostne študije, ki vključujejo preprihovanje raztopine z dušikom (negativna kontrola) in kisikom (pozitivna kontrola), se uporabljajo za določanje vpliva molekularnega kisika na oksidacijo. Če ima kisik vpliv na oksidativno reaktivnost učinkovine, se lahko vključi v reakcijo oksidacije in tako omogoči njen potek (32,39).

- *svetloba*

Oksidacije so povezane z vplivom svetlobe, ki zaradi ionizirajočega sevanja omogoča nastanek prostih radikalov in posledično razpadnih produktov. Svetloba lahko inducira fazo iniciacije pri nastanku radikalov (39).

- *temperatura*

Dvig temperature pri večini kemičnih in fizikalnih sprememb povzroči dvig hitrosti reakcij. Za večino kemijskih procesov predvidevamo večjo stabilnost pri nižjih

temperaturah, vendar znižanje hitrosti oksidacije pri nižjih temperaturah ni tako značilno kot pri ostalih kemijskih reakcijah. Učinek temperature na reakcije oksidacije v vodnih medijih je nasprotujoč, saj dvig temperature povzroči hitrejšo oksidacijo učinkovine, ampak hkrati zniža topnost kisika v vodi. Ravno ta določa obseg oksidacije, zato vpliv temperature na oksidacijo ne sledi Arrheniusovi enačbi (30,39).

- *kovinski ioni*

Kovinski ioni prehodnih elementov (M^{n+}) katalizirajo oksidacije, saj se pri reakciji ne porablajo, omogočajo odcep elektrona iz molekule in s tem nastanek radikala, ki mora biti dokaj stabilen, da lahko oksidacija poteče. Radikali nato reagirajo s kisikom. Sledovi kovinskih ionov tako katalizirajo reakcije avtooksidacije, že 0,05 ppm bakrovih ionov zadostuje za iniciacijo oksidacije maščobnih kislin, ki se nato nadaljuje z fazo propagacije. Viri kovinskih ionov so lahko številni: od kovinske opreme v procesu proizvodnje, učinkovin naravnega izvora, vode, pomožnih snovi (32,39).

1.3.3 Preprečevanje oksidacije

Preden pristopimo k preprečevanju oksidacije moramo ugotoviti, kateri dejavniki vplivajo na reakcijo oksidacije in preprečiti njihovo delovanje. Z namenom preprečevanja ali vsaj zmanjšanja obsega oksidacije moramo upoštevati naslednje: shranjevanje v hladilniku in zaščiteno pred svetlobo, optimiziranje pH pripravka, deoksigeniranje raztopine z inertnim plinom, odstranitev ali zamenjava pomožnih snovi, ki lahko predstavljajo vnos kovinskih ionov ali peroksidov v pripravek, dodatek antioksidantov, liofilizacija pripravka in uporaba primerne ovojnine.

Optimalno je uporabiti kombinacijo antioksidantov, ki delujejo sinergistično in na različnih nivojih, tako da se doda manjšo količino vsake substance. Antioksidanti delujejo v višjih koncentracijah kot prooksidanti (askorbinska kislina), saj pri njihovi oksidaciji nastajajo radikali. Učinkovitost antioksidantov je odvisna od medija, v katerem se nahajajo. Delimo jih na prave antioksidante, redoks stabilizatorje in antioksidante sinergiste. **Pravi antioksidanti** lovijo proste radikale in s tem zavirajo verižno reakcijo. Imajo šibko vezan vodikov atom v molekuli in tako nastanejo iz njih radikali, ki pa niso zelo reaktivni in se pretvorijo v nevtralne molekule, tako da ponovno sprejmejo vodikov atom npr. od antioksidanta sinergista. In na ta način podaljšajo fazo iniciacije verižne reakcije. Te spojine so učinkovite pri zaviranju reakcije avtooksidacije v lipofilnih sistemih, ne pa pri

redoks reakcijah. Med njih uvrščamo naravne (vitamin E) in sintezne spojine (butilhidroksianizol, butilhidroksitoluen). Ponavadi se dodaja še antioksidant sinergist. **Redoks stabilizatorji** so reducenti, ki imajo nižji redoks potencial od učinkovin, ki jih želimo zaščititi pred oksidacijo. Zmanjšajo obseg oksidacije, saj se sami podvržejo oksidaciji. Učinkoviti so tudi pri zaviranju verižne reakcije v procesu avtooksidacije učinkovin ali pomožnih snovi. Najbolj uporabljeni med anorganskimi so žveplove spojine (natrijev bisulfit, natrijev sulfid), med organskimi pa glutation, askorbinska kislina, cistein. **Antioksidanti sinergisti** so spojine, ki povečajo učinek antioksidantov, čeprav imajo sami majhno antioksidativno aktivnost. Njihova glavna naloga je vezava kovinskih ionov s tvorbo kompleksov, zato med njih uvrščamo kelatorje (EDTA, citronska in vinska kislina, številne aminokisliline). Ti sinergisti se uporabljajo skupaj s pravimi antioksidanti v lipofilnih sistemih, saj tvorijo kelate s kovinskimi ioni ali donirajo vodikov atom za regeneracijo antioksidanta. Lastnosti idealnega antioksidanta so, da je učinkovit pri nizkih koncentracijah in je kompatibilen s številnimi spojinami, kemično in fizikalno stabilen v širokem območju temperature in pH, dobro topen pri uporabljeni koncentraciji, kompatibilen z različnimi vrstami materialov v vsebnikih, je brez vonja, okusa in barve, je netoksičen, nekarcinogen in ne povzroča preobčutljivostnih reakcij pri uporabljenih koncentracijah (32,39).

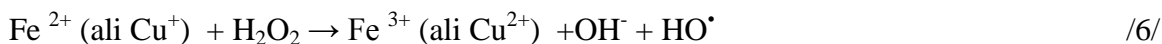
1.3.4 Nastanek radikalov in preprečevanje oksidacije v bioloških sistemih

Kisik je pomemben dejavnik, ki sodeluje v procesih oksidacije. V zraku prevladuje tripletni kisik ($^3\text{O}_2$) 20,9% ter v sledovih še ozon, singletnega kisika ($^1\text{O}_2$), v zraku pa praktično ni. Tripletni kisik zaradi svoje razporeditve elektronov zlahka sprejme en elektron. Nastane superoksidni (mono) radikal.



Elektroni, ki jih v celici sprejme molekula O_2 , prihajajo iz dihalne verige ali iz drugih virov. Del superoksidnega radikala pa nastane namenoma, saj ta v fagocitih pomaga uničiti tujke in bakterije. Vodikov peroksid (H_2O_2), ki nastaja v reakciji pretvorbe superoksidnega radikala in še v nekaterih drugih encimskih in neencimskih reakcijah, je za celico še vedno nevaren, saj je: oksidant, po transportnih lastnostih podoben vodi in ker iz njega lahko nekontrolirano nastaja hidroksilni radikal (HO^{\cdot}). Vodikov peroksid lahko podobno kot voda difundira po celici in tudi skozi biološke membrane. Pri interakciji z Fe^{2+} ali Cu^+ ionom pride do Fentonove reakcije, v kateri se kovinski ion oksidira, vodikov peroksid pa

pretvori v hidroksilni anion (OH^-) in v izredno reaktivni in zato nevarni hidroksilni radikal (HO^\bullet).



Kemična reaktivnost HO^\bullet je tolikšna, da brez težav sproži nenadzorovane oksidacije v celici, ker lahko reagira z nukleinskimi kislinami, proteini in lipidi.

V bioloških sistemih so se razvili zaščitni mehanizmi pred škodljivim delovanjem radikalov, ki nadzirajo njihovo nastajanje in zmanjšajo potencialno škodo. Med sodelujočimi encimi je pomembnejša superoksidna dizmutaza (SOD), ki je sposobna znižati koncentracijo $\text{O}_2^{\bullet-}$. Ker je superoksidni radikal kot radikal nevaren, ga organizem v reakciji disproporcionacije neprestano odstranjuje tako, da ga pretvarja v vodikov peroksid in O_2 . SOD je pomemben antioksidativni encim in prvi člen v verigi antioksidantov. Nahaja se v citosolu in mitohondrijskemu matriksu. Ekstracelularno je vezana na površino celic in na kolagen. SOD pretvori $\text{O}_2^{\bullet-}$ do vodikovega peroksida v reakciji 7.



Pretvorbo H_2O_2 katalizirajo katalaze in še nekateri drugimi encimi. Katalaze pretvarjajo H_2O_2 v vodo in tripletni kisik, kot je prikazano v reakciji 8. Vendar odstranjevanje superoksidnega radikala in H_2O_2 še ni dovolj za zaviranje nenadzorovanih procesov oksidacije. Potrebni so še najrazličnejši drugi antioksidanti (34).



Vitamin C in vitamin E sta pomembna antioksidanta v bioloških sistemih, saj sta relativno neškodljiva (ne povzročita močne redukcije in oksidacije), njuni radikali šibko reagirajo s kisikom (ne nastane veliko superoksida ali peroksi radikala), v majhnih koncentracijah sta učinkovita in se lahko regenerirata z encimskimi sistemi (33).

Za razliko od CoQ10 pa je ubikinol učinkovit antioksidant, ki prekine verižno reakcijo oksidacije. Vitamin E in CoQ10 delujeta sinergistično, tako da ubikinol reagira z α -tokoferol radikalom, pri čemer se ta regenerira do α -tokoferola (35).

2 NAMEN DELA

Danes je na tržišču obilo prehranskih dopolnil s koencimom Q10 v različnih oblikah z namenom preprečevanja in zdravljenja nekaterih obolenj. Med njimi so oljne suspenzije ubikinona z dodatkom emulgatorjev najbolj zastopane. V zadnjem času pa je vse bolj aktualna reducirana oblika-ubikinol (rQ10), ki ima boljšo biološko uporabnost. V organizmu po zaužitju CoQ10 pride do spontane redukcije do ubikinola in ravno redoks ravnotežje med obema oblikama določa vlogo oQ10 v telesu.

Namen diplomske naloge bo vrednotenje oksidativne stabilnosti ubikinona ob prisotnosti različnih antioksidantov prisotnih v prehranskih dopolnilih npr. askorbinska kislina, elagična kislina, kvercetin in vitamin E z metodo HPLC. V predhodni diplomski nalogi (38) so namreč ugotovili upadanje vsebnosti CoQ10 in naraščanje deleža rQ10 skozi daljše časovno obdobje v prehranskih dopolnilih, ki so vsebovali kombinacijo CoQ10 in askorbinske kisline. HPLC metodo (38) bomo za namene spremljanja stabilnosti CoQ10 prilagodili in kasneje tudi ustrezno validirali. Najprej bomo izbrali dva izdelka s CoQ10, ki sta dostopna na tržišču, in sicer eden od njiju vsebuje poleg CoQ10 tudi askorbinsko kislino in vitamin E, medtem ko drugi le CoQ10. Stabilnost CoQ10 bomo spremljali 6 tednov pri 40°C in relativni vlažnosti 75% in jih tedensko vzorčili ter analizirali z metodo HPLC, da potrdimo upadanje deleža oQ10 in naraščanje deleža rQ10. Podrobneje bomo spremljali stabilnost oQ10 ob prisotnosti askorbinske kisline, kasneje pa tudi ob prisotnosti ostalih antioksidantov (kvercetin, elagična kislina, vitamin E) v treh različnih koncentracijah, ki bodo izpostavljeni temperaturnim obremenitvam pri nadzorovanih pogojih. Kot medij bomo izbrali brezvodni etanol, preverili pa bomo tudi stabilnost oQ10 v 50% etanolu in nekaterih rastlinskih oljih, ki se najpogosteje dodajajo k oljnim kapsulam v prehranskih dopolnilih. V nadaljevanju bomo spremljali nestabilnost oQ10 ob prisotnosti nekaterih znanih reducentov, in sicer bomo izbrali: 1,4-ditio-DL-treitol in natrijev sulfid. Podobno kot v primeru askorbinske kisline bomo vzorce izpostavili trem različnim koncentracijam dodanega reducenta in vrednotili nastajanje rQ10 v odvisnosti od temperature in časa z metodo HPLC. Ker je znano, da je stabilnost askorbinske kisline problematična, bomo ugotavljali tudi njeno stabilnost v različnih medijih (brezvodni etanol, 50% etanol, voda) pri 25 in 40°C pri treh različnih koncentracijah kot v stabilnostni študiji CoQ10 ob prisotnosti askorbinske kisline. Za vrednotenje askorbinske kisline bomo uporabili metodo HPLC.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 REAGENTI, RAZTOPINE, SUBSTANCE

- Ubidekarenon, $C_{59}H_{90}O_4$, $M_r = 863$ g/mol, pure material (USP reference standard for test & assay), KanekaQ10™
- L-askorbinska kislina, $C_6H_8O_6$, $M_r = 176$ g/mol, min. 99% (HPLC), Sigma-Aldrich
- Elagična kislina, $C_{14}H_6O_8$, $M_r = 302,19$ g/mol, min. 95%, Sigma-Aldrich
- Kvercetin dihidrat, $C_{15}H_{10}O_7 \times 2H_2O$, $M_r = 338,26$ g/mol, min. 98% (HPLC), Sigma-Aldrich
- $\pm\alpha$ -tokoferol Ph.Eur, $C_{29}H_{50}O_2$, $M_r = 430,72$ g/mol, Ph. Eur, Fluka
- 1,4 Ditio-DL-treitol, $C_4H_{10}O_2S_2$, $M_r = 154,25$ g/mol, min.99,7%, BioChemika, Fluka
- Železov (III) klorid brezvodni, $FeCl_3$, $M_r = 162,2$ g/mol, Riedel-de Haen
- Železov (II) klorid tetrahidrat, $FeCl_2 \times 4H_2O$, $M_r = 198,83$ g/mol, Riedel-de Haen
- HCOOH (mravljična kislina), CH_2O_2 , $M_r = 46,03$ g/mol, 98-100% Suprapur, Merck
- Acetonitril, C_2H_3N , Chromasolv for HPLC, gradient grade; $M_r = 41,05$ g/mol, Sigma-Aldrich
- n-heksan, purris p.s., Reag. Ph. Eur, Riedel-de Haen
- brezvodni etanol-etanol absolutni, C_2H_5OH , purris p.a. Reag. Ph. Eur, Sigma-Aldrich
- tetrahidrofuran, C_4H_8O , $M_r = 72,1$ g/mol Chromasolv for HPLC $M_r = 72,1$ g/mol, Sigma-Aldrich
- topilo: heksan:brezvodni etanol = 5:2, v/v
- H_3PO_4 (ortofosforjeva kislina, 85%) p.a, $M_r = 98,00$ g/mol, Merck
- Metanol, CH_3OH p.a, $M_r = 32,04$ g/mol, Sigma-Aldrich
- Mili Q voda, Fakulteta za farmacijo
- sojino olje, Družina Pečarič, rok uporabe: 01.12.2012
- laneno olje, Tovarna olja GEA, rok uporabe: 4.12. 2012
- Zvezda sončnično olje, Tovarna olja GEA, rok uporabe: 22.11. 2012
- Zvezda ekstra deviško olje, Tovarna olja GEA, rok uporabe: 07.02.2013

- Izdelek A: Pharma Nord Super Bio-Qinon Q10[®]; ser.št.L11001755, rok uporabe: 31.3.2015 (CoQ10 30 mg, želatina, glicerol, amonijev karamel, redestilirana voda, TiO₂, palmino olje)
- Izdelek B: Fidi Koencim10[®], ser.št.1442930001, rok uporabe: 02. 2013 (CoQ10; 30 mg, vitamin C;40 mg, naravni vitamin E; 24 mg, selen;15 µg, koruzno olje, maščoba iz surovega masla, rafinirano hidrogenirano in delno hidrogenirano sojino olje, β-karoten)

3.1.2 NAPRAVE IN PRIBOR

- digitalni tehtnici AG 245 in H 5AR, Mettler Toledo
- Hladilnik LTH
- Klimatska komora Vötsch VC 4034
- Vodni kopeli WB 13 in WB 30E, Kambič
- Ultrazvočni čistilec Sonis 4, Iskra
- Sistem za pripravo MiliQ vode 30 L, Millipore, Billerica
- Avtomatske pipete 20-200 µL, 100-1000 µL, 1-5 mL, 1-10 mL, Eppendorf
- Stekleni inventar: čaše, merilni valji, merilne bučke, tehtiči, vialo, kapalke, epruvete z zamaški
- Ostalo: spatula, alu-folija, Parafilm M[®]
- HPLC sistem 1100 series (Agilent Technologies) vključuje: razplinjevalec, kvarterna črpalka, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, UV-VIS detektor, programska oprema ChemStation
- Analitski sistem LC-MS/MS: Agilent 1290 Infinity LC in Agilent 6460 Quadrupole Jetstream[®] LC/MS (Agilent Technologies), Infinity 1290 vključuje: razplinjevalec, binarno črpalko, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, UV-VIS detektor, 6460 Quadrupole Jetstream[®] LC/MS vključuje: ESI ionski izvor, programski sistem za obdelavo podatkov MassHunter Workstation software B.04.01

3.2 ANALIZNE METODE

3.2.1 Pogoji HPLC metode za vrednotenje ubikinona

Kolona: Luna C18 (2), 5µm, 250 x 4,6 mm s predkolono Luna C18 (2), 4 x 3 mm, Phenomenex

Temperatura kolone: 25 °C

Mobilna faza: acetonitril: tetrahidrofuran: voda = 55: 40: 5

Pretok mobilne faze: 1,5 mL/ min

Volumen injiciranja: 15 μ L

Valovna dolžina detekcije: 280 nm

Čas analize: 13 min

Retencijski čas ubikinona: 11,2 min

3.2.2 Pogoji HPLC metode za vrednotenje askorbinske kisline

Kolona: Synergi Hydro-RP, 4 μ , 250 x 4,60 mm, Phenomenex

Temperatura kolone: 40 °C

Mobilna faza: 0,1% H₃PO₄ : ACN = 90:10

Pretok mobilne faze: 1,2 mL/ min

Volumen injiciranja: 2 μ L

Valovna dolžina detekcije: 254 nm

Čas analize: 3 min

Retencijski čas askorbinske kisline: 2,2 min

3.2.3 Pogoji LC-MS metode za identifikacijo ubikinola

Predkolona: Luna C18 (2) 4 x 2 mm, Phenomenex

Temperatura kolone: 40 °C

Mobilna faza: 100% MeOH

Pretok mobilne faze: 0,3 mL/ min

Volumen injiciranja: 1 μ L

MS detekcija: Scan način m/z 100-1000 v pozitivnem načinu ionizacije

3.3 PRIPRAVA VZORCEV

3.3.1 Priprava standardnih raztopin

3.3.1.1 Priprava standardne raztopine CoQ10

Natančno smo natehtali 10,0 mg referenčnega standarda ubidekarena in ga raztopili v 10 mL bučki s topilom (heksan, brezvodni etanol 5:2). To raztopino smo 20x redčili, tako da je bila koncentracija dobljene raztopine 50 µg/ mL.

3.3.1.2 Priprava standardnih raztopin za validacijo HPLC metode

Priprava standardne raztopine CoQ10 za vrednotenje linearnosti

Za pripravo standardne raztopine CoQ10 smo 500µL alikvota standardne raztopine prenesli v vialo in dopolnili do 1mL z brezvodnim etanolom ter neposredno analizirali z metodo HPLC.

Standardno raztopino askorbinske kisline, kvercetina, elagične kisline smo pripravili tako, da smo natehtali 3,35 mg ustreznega standarda ter ga kvantitativno prenesli v 5 mL bučko in dopolnili do oznake z brezvodnim etanolom. Del vzorcev smo prenesli v vialo z insertom in neposredno analizirali z metodo HPLC.

Standardno raztopino vitamina E smo pripravili tako, da smo natehtali 2 mg standarda vitamina E in ga kvantitativno prenesli v 5 mL bučko in dopolnili do oznake z brezvodnim etanolom. Del vzorcev smo prenesli v vialo z insertom in neposredno analizirali z metodo HPLC.

Za pripravo standardne raztopine DTT in Na₂S smo natehtali 14,63 mg standarda DTT in 7,41 mg Na₂S ter nato vsakega od njiju posebej prenesli v 5 mL bučko in dopolnili do oznake z brezvodnim etanolom. Del vzorcev smo prenesli v vialo z insertom in neposredno analizirali z metodo HPLC.

Za proučevanje stabilnosti CoQ10 v izbranih rastlinskih oljih smo del posameznega vzorca prenesli v vialo z insertom in neposredno analizirali z metodo HPLC.

Priprava standardne raztopine CoQ10 za vrednotenje linearnosti

Za izdelavo umeritvene premice smo pripravili devet raztopin različnih koncentracij CoQ10. Iz standardne raztopine s koncentracijo 50 µg/mL smo pripravili naslednje

raztopine, tako da smo vzeli alikvote osnovne raztopine po 20, 50, 100, 200, 400, 500, 600, 800, 1000 μL ter jih v vialah dopolnili do 1 mL z brezvodnim etanolom. Tako smo pripravili raztopine standarda s koncentracijo 1, 2,5, 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50 $\mu\text{g/mL}$.

Priprava standardne raztopine CoQ10 za vrednotenje ponovljivosti, točnosti

Za vrednotenje dnevne in meddnevne ponovljivosti in točnosti smo pripravili tri kontrolne vzorce različnih koncentracij (5, 25, 40 $\mu\text{g/mL}$), ki so na enak način kot pri vrednotenju linearnosti pokrile celotno delovno območje analizne metode.

Priprava vzorcev z dodatkom standarda CoQ10 za vrednotenje učinkovitosti ekstrakcije

Za vrednotenje učinkovitosti ekstrakcije smo pripravili tri kontrolne vzorce s koncentracijami 5, 25, 40 $\mu\text{g/mL}$, tako da smo natehtali 40 mg standarda CoQ10 v 5 mL bučko ter dopolnili do oznake s sojinim oljem. Nato smo suspenzijo 200x redčili, tako da smo odpipetirali 125 μL v 25 mL bučko in dopolnili do oznake z brezvodnim etanolom. Tako smo pripravili kontrolni vzorec s koncentracijo 40 $\mu\text{g/mL}$. Za pripravo vzorca s koncentracijo 25 $\mu\text{g/mL}$ smo odpipetirali 2,5 mL začetne suspenzije in dopolnili v epruveti s sojinim oljem do 4 mL. Nato smo ponovno redčili 200x. Kontrolni vzorec s koncentracijo 5 $\mu\text{g/mL}$ smo pripravili tako, da smo odpipetirali 0,5 mL začetne suspenzije in v epruveti dopolnili do 4 mL s sojinim oljem ter ponovno 200x redčili z brezvodnim etanolom. Vzorce smo neposredno analizirali z metodo HPLC z dvakratnim injiciranjem.

3.3.2 Identifikacija ubikinola z LC-MS

Lovili smo kromatografske vrhove vzorca izdelka B, ki je vseboval oQ10 ($t_r=11,2$ min) in rQ10 ($t_r=10,3$ min), neposredno iz HPLC sistema v posamezno vialo in nato injicirali na LC-MS/MS sistem (Slika 21A,B).

3.3.3 Stabilnost pripravkov s CoQ10

3.3.3.1 Priprava raztopine FeCl_3

Za pripravo 0,1% FeCl_3 smo natančno natehtali 79 mg železovega (III) klorida in ga prenesli v 100 mL merilno bučko ter dopolnili do oznake z brezvodnim etanolom.

3.3.3.2 Priprava vzorcev

Najprej smo vzeli štiri kapsule od vsakega od obeh izdelkov, jih prerezali s skalpelom in kvantitativno prenesli vsebino kapsul v 100 ml bučko. To smo dopolnili do oznake s

topilom, nekaj minut stresali in centrifugirali 10 minut pri 3200 obratov/minuto. 1 ml supernatanta smo prenesli v 25 ml bučko, dodali 2,5 ml 0,1% raztopine železovega (III) klorida in dopolnili do oznake z brezvodnim etanolom. Del posameznega vzorca smo prenesli v vialo z insertom in analizirali z metodo HPLC z dvakratnim injiciranjem.

Za spremljanje deleža reducirane oblike CoQ10 v obeh izdelkih smo 1 mL supernatanta dopolnili z brezvodnim etanolom do oznake v 25 mL bučki in analizirali po enakem postopku kot vzorec z dodatkom FeCl₃.

3.3.3.3 Določanje deleža oQ10 in rQ10

Na osnovi ugotovljenih površin kromatografskih vrhov pri retencijskem času 11,2 min vzorčnih raztopin smo po enačbi 2 izračunali delež oQ10 in po enačbi 3 rQ10 pri obeh izdelkih.

$$W_o = (R_{vo} / R_s) \times 100\% \quad (\text{enačba 2})$$

W_o: delež ubikinona v vzorcu izražen v %

R_{vo}: odziv vzorčne raztopine, pripravljene brez dodatka raztopine FeCl₃

R_s: odziv vzorčne raztopine z dodatkom FeCl₃

$$W_r = (100 - W_o)$$

W_r: delež ubikinola v vzorcu izražen v % (enačba 3)

3.3.4 Stabilnost standarda CoQ10

Iz standardne raztopine CoQ10 smo odpipetirali 3 mL v epruveto in dodali 3mL brezvodnega etanola. Tako smo dobili raztopino s koncentracijo 25 µg/ mL. Pripravili smo tri paralelke in jih izpostavili temperaturni obremenitvi pri štirih različnih temperaturah (25, 40, 50, 60°C) na vodni kopeli. Vzorčili smo v časovnih intervalih ob 0, 1, 2, 6, 9 dni ter vzorce neposredno analizirali z metodo HPLC.

3.3.5 Stabilnost CoQ10 ob prisotnosti askorbinske kisline in ostalih antioksidantov

Pripravili smo raztopine s tremi različnimi koncentracijami askorbinske kisline. Najprej smo natehtali 3,35 mg standarda askorbinske kisline v 5 mL bučko in dopolnili do oznake z brezvodnim etanolom. Tako smo pripravili osnovno raztopino s koncentracijo 670 µg/mL (oznaka H), ki je bila 10x višja glede na koncentracijo askorbinske kisline, ki je dodana izdelkom s CoQ10, kot prikazuje preglednica II. Za pripravo raztopine z oznako M in L smo redčili 10x oz. 100x osnovno raztopino askorbinske kisline (H). V epruvete z

zamaški smo dodali ustrezni volumen raztopine askorbinske kisline in ostalih antioksidantov ter oQ10 glede na razmerje med njimi, kot prikazuje preglednica II, tako da je bil končni volumen vzorca 6 mL. Pripravili smo tri paralelke vzorcev in jih izpostavili temperaturni obremenitvi 25, 40, 50, 60°C na vodni kopeli. Pripravili smo tudi tri paralelke kontrolnih vzorcev, tako da smo 3mL standardne raztopine oQ10 s koncentracijo 50 µg/mL prenesli v epruvete z zamaškom in dodali 3 mL brezvodnega etanola. Vzorčili smo v časovnih intervalih ob 0, 1, 2, 6, 9 dni ter vzorce neposredno analizirali z metodo HPLC. Vzorce, kjer smo osnovni raztopini CoQ10 dodali elagično kislino, vitamin E in kvercetin smo izpostavili le temperaturi 40°C na vodni kopeli. Vzorce smo pripravili na enaak način kot pri dodatku askorbinske kisline. Volumen posameznih raztopin za pripravo vseh vzorcev je prikazan v preglednici II. Vzorčili smo v časovnih intervalih ob 0, 1, 2, 6, 9 dni ter vzorce neposredno analizirali z metodo HPLC.

Preglednica II: Priprava vzorcev standardne raztopine CoQ10 z dodatkom različnih antioksidantov: AK (askorbinska kislina), EA (elagična kislina), KV (kvercetin), vit. E v treh različnih koncentracijah in kontrolnega vzorca (H-najvišja koncentracija, M-srednja koncentracija, L-najnižja koncentracija, C-kontrolni vzorec)

DODAN ANTIOKSIDANT	H (µg/mL)/aliquot	M (µg/mL)/aliquot	L (µg/mL)/aliquot	C (µg/mL)/aliquot
AK	670/ 3mL	67 /300µL	6,7/30µL	/
EA	670/ 3mL	67/300µL	6,7/30µL	/
VIT. E	400 /3mL	40/300µL	4,0/30µL	/
KV	670 /3mL	67/300µL	6,7/30 µL	/
V CoQ10 *	50/3mL	50/3mL	50/3mL	50/3mL
V EtOH	/	2,7mL	2,97mL	3mL

*k vsakemu antioksidantu je bil dodan CoQ10

3.3.6 Stabilnost CoQ10 ob prisotnosti reducentov

3.3.6.1 Dodatek DTT in Na₂S

Pripravili smo 3,8 mM raztopino DTT/Na₂S, tako da smo natehtali 14,63/2,96 mg ustreznega standarda v 5mL bučko in dopolnili do oznake z brezvodnim etanolom. Osnovni raztopini CoQ10 s koncentracijo 50 µg/mL smo dodali različne volumne raztopine DTT ali Na₂S, kot prikazuje preglednica III na enak način, kot je opisano v poglavju 3.3.5 Stabilnostna študija CoQ10 ob prisotnosti askorbinske kisline in ostalih

antioksidantov. Tri paralelke vzorcev smo izpostavili temperaturi 40°C na vodni kopeli. Stabilnost CoQ10 z dodanim DTT in Na₂S s koncentracijama M in L v dveh paralelkah pa smo spremljali pri 50 in 60°C prav tako na vodni kopeli pri 40°C.

Prav tako smo pripravili tri paralelke kontrolnih vzorcev, tako da smo 3 mL standardne raztopine CoQ10 s koncentracijo 50 µg/mL pomešali s 3 mL brezvodnega etanola v epruветah z zamaški. Vzorčili smo v časovnih intervalih ob 0, 1, 2, 6, 9 dni ter vzorce neposredno analizirali z metodo HPLC.

Za spremljanje stabilnosti CoQ10 ob prisotnosti DTT v krajšem časovnem intervalu z avtomatskim vzorčevalnikom HPLC sistema smo pripravili raztopino DTT s koncentracijo H v skladu s postopkom 3.3.6.1. Vzorec smo injicirali 5x zaporedoma v intervalu 15 min.

Preglednica III: Priprava vzorcev standardne raztopine CoQ10 z dodatkom reducentov DTT ali Na₂S v treh različnih koncentracijah in kontrolnega vzorca (H-najvišja koncentracija, M-srednja koncentracija, L-najnižja koncentracija, C-kontrolni vzorec)

	H/alikvot	M/alikvot	L/alikvot	C/alikvot
DTT oz. Na₂S	3,8 mM /3mL	0,38 mM/300µL	0,038 mM/30µL	/
V razt. CoQ10 *	50µg/mL /3 mL	50 µg/mL /3ml	50 µg/mL /3mL	50 µg/mL /3mL
V EtOH	/	2,7mL	2,97 mL	3mL

*k vsakemu reducentu je bil dodan CoQ10

3.3.6.2 Dodatek reducirajočih spojin; HCOOH in Fe²⁺

Za pripravo 2,0 mM raztopine HCOOH smo odpipetirali 600 µL HCOOH v 25 mL bučko in dopolnili do oznake z brezvodnim etanolom. Vzorce smo postavili na vodno kopel pri 40°C. Vzorčili smo v časovnih intervalih ob 0, 1, 2, 6, 9 dni ter vzorce neposredno analizirali z metodo HPLC.

Za pripravo 0,1% raztopine Fe²⁺ smo natehtali 56,0 mg standarda FeCl₂ x 4H₂O v 50 mL bučko in dopolnili do oznake z brezvodnim etanolom. Eno paralelko vzorcev smo postavili na vodno kopel pri 40°C.

3.3.7 Stabilnost CoQ10 v različnih medijih

3.3.7.1 Stabilnost CoQ10 v rastlinskih oljih

V 10 mL bučko smo natehtali 50 mg standarda CoQ10 in 67 mg AK ter dopolnili do oznake z enim od uporabljenih olj, ki se najpogosteje nahajajo v izdelkih s CoQ10 (sojino, olivno, laneno ali sončnično). Za pripravo vzorca z dodanim vitaminom E v enaki koncentraciji kot v prehranskih dopolnilih smo natehtali še 40 mg standarda α -tokoferola. Vsak posamezen vzorec v obliki suspenzije smo homogenizirali v ultrazvočni kadički in postavili v klimatsko komoro z nadzorovano temperaturo 40°C in relativno vlažnostjo 75%. Vzorčili smo v časovnih intervalih ob 0, 5, 7, 14, 21 dni, tako da smo pripravljeno suspenzijo najprej 200x redčili. In sicer smo v treh paralelkah odpipetirali po 125 μ L suspenzije v 25mL bučke in dopolnili do oznake in vzorce neposredno analizirali z metodo HPLC.

Za pripravo kontrolnega vzorca smo natehtali 50 mg standarda CoQ10 v 10 mL bučko in dopolnili do oznake s sojinim oljem. Vzorec smo homogenizirali s pomočjo ultrazvočne kadičke in postavili v klimatsko komoro z nadzorovano temperaturo 40°C in relativno vlažnostjo 75%. Vzorčili smo v časovnih intervalih ob 0, 5, 7, 14, 21 dni, tako da smo pripravljeno suspenzijo najprej 200x redčili. In sicer smo v treh paralelkah odpipetirali po 125 μ L suspenzije v 25 mL bučke in dopolnili do oznake in vzorce neposredno analizirali z metodo HPLC.

3.3.8 Stabilnost askorbinske kisline v različnih medijih

Za spremljanje stabilnosti askorbinske kisline smo pripravili tri paralelke vzorcev v vseh treh koncentracijah (H, M, L) v brezvodnem etanolu ter jih postavili na vodno kopel pri 25 in 40°C. Kot pri postopku 3.3.5 Stabilnost CoQ10 ob prisotnosti askorbinske kisline in ostalih antioksidantov smo najprej pripravili osnovno raztopino askorbinske kisline s koncentracijo H, ki smo jo nato 10x in 100x redčili. Nato smo pripravili tri paralelke vseh treh koncentracij v še dveh različnih medijih; MiliQ voda, 50% etanol in jih postavili na vodno kopel pri 25 in 40°C. Vzorce smo analizirali ob času 0, 1, 2, 3, 4 dni z metodo HPLC za vrednotenje askorbinske kisline.

3.4 VREDNOTENJE HPLC METODE

Analizno metodo je potrebno validirati oz. dokazati, da je primerna za merjenje želenega analita. Validacija je dokumentiran postopek dokazovanja, ki z veliko stopnjo zaupanja zagotavlja ustreznost metode, da ta daje zanesljive rezultate. Obseg validacije je odvisen

od izbire analizne metode in je med drugim naveden v ICH (International Conference on Harmonisation) smernici za validacijo analiznih metod. Validacijo moramo izvesti v celoti oz. delno ob vsaki spremembi analizne metode. V okviru diplomskega dela smo izvajali validacijo HPLC metode v treh zaporednih dneh in opredelili selektivnost, linearnost, natančnost, točnost, izkoristek ekstrakcije, mejo zaznavnosti in določitev, stabilnost vzorcev in robustnost (36).

3.4.1 Selektivnost

Selektivnost metode se nanaša na sposobnost metode, da analizira točno določen analit ob prisotnosti ostalih komponent v vzorcu. Metoda je selektivna, kadar so kromatografski vrhovi v kromatogramu analiznih komponent vzorca jasno ločeni oz. se ne prekrivajo in med komponentami ni interferenc (36). Analizirali smo najprej raztopine medijev, v katerih so bili pripravljene vzorci; brezvodni etanol, sojino olje. Nato smo analizirali standarde izbranih antioksidantov in reducentov, ki smo jih kasneje v stabilnostni študiji dodali k oQ10; AK, EA, KV, vitamin E, DTT, Na₂S. Nato pa še kontrolne vzorce z dodatkom standarda CoQ10 v sojinem olju, brezvodnem etanolu in izdelek Fidi Koencim 10[®] v skladu s postopkom 3.3.1.2 Priprava standardnih raztopin za validacijo.

3.4.2 Linearnost

Linearnost analizne metode pomeni sposobnost, da znotraj določenega območja metoda zagotavlja rezultate, ki so neposredno premosorazmerni s koncentracijo ali posredno preko ustreznega matematičnega modela. Linearnost razmerja med obema spremenljivkama preverimo s pomočjo regresijske premice, ki je dobljena na osnovi metode najmanjših kvadratov. Rezultat regresijske analize je umeritvena premica z enačbo: $y = bx + a$, pri čemer je y odziv (površina ali višina kromatografskih vrhov), a odsek na ordinati in b naklon premice. Korelacijo med odzivom in koncentracijo podajamo s Pearsonovim koeficientom (R) oz. determinacijskim koeficientom (R^2), ki ima pri popolni linearni povezavi vrednost 1 (36). Z metodo najmanjših kvadratov smo na podlagi površin kromatografskih vrhov iz 9 točk v območju od 1-50 µg/mL vsak posamezen dan izdelali umeritveno premico.

Iz dobljenih odzivov smo določili pripadajočo enačbo umeritvene premice in determinacijski koeficient (R^2). Kot spodnjo mejo sprejemljivosti smo določili $R^2 > 0,9990$.

3.4.3 Območje linearnosti

Območje analizne metode obsega interval med spodnjo in zgornjo koncentracijo vključno z obema, znotraj katerega analizna metoda zagotavlja rezultate z ustrezno natančnostjo, točnostjo in linearnostjo. Običajno se območje določi iz linearnosti in je odvisno od namena metode. Analizna metoda mora imeti ustrezno točnost, natančnost in linearnost (36). Za naše potrebe smo preverjali delovno območje od 1 do 50 µg/mL.

3.4.4 Ponovljivost

Natančnost analizne metode pomeni stopnjo ponovljivosti oz. razpršenosti med serijo analiz istega homogenega vzorca pod predpisanimi eksperimentalni pogoji. Ločimo ponovljivost, vmesno ponovljivost, reproducibilnost. Merilo za natančnost je standardna (SD) in relativna standardna deviacija (RSD) (36).

Pripravili smo tri različne kontrolne vzorce standardne raztopine oQ10 s koncentracijami 5, 25 in 40 µg/mL vsakega v treh paralelkah kot je opisano v postopku 3.3.1.2. Za posamezno koncentracijo standardne raztopine oQ10 smo primerjali stopnjo ujemanja odzivov treh paralelk po treh zaporednih injiciranjih v enem dnevu in tako ugotavljali dnevno ponovljivost. Za določitev meddnevne ponovljivosti smo analizirali kontrolne vzorce, ki smo jih pripravili v treh zaporednih dnevih s trikratnim injiciranjem in primerjali stopnjo skladanja med tremi dnevi. Ponovljivost injiciranja smo vrednotili pri istih kontrolnih vzorcih po trikratnem injiciranju. Rezultat smo podali kot RSD%. Meja sprejemljivosti RSD je 5%.

3.4.5 Točnost

Točnost analizne metode izraža ujemanje izmerjene vrednosti z dejansko vrednostjo. Iz enačbe umeritvene premice smo iz odzivov izračunali ustrezne koncentracije standardnih raztopin in jih primerjali z dejanskimi. Za vrednotenje točnosti smo uporabili iste kontrolne vzorce kot pri vrednotenju natančnosti (3.4.4). Točnost rezultatov znotraj dneva in med dnevi smo podali relativno, pri čemer smo pri izračunu uporabili enačbo 4. C_t je dejanska koncentracija, C_i pa izračunana koncentracija (36). Za dnevno in meddnevno točnost smo kot mejo sprejemljivosti določili $100 \pm 5\%$.

$$\text{Točnost (\%)} = C_i / C_t \times 100\% \quad (\text{enačba 4})$$

3.4.6 Izkoristek ekstrakcije

Kriterij za točnost metode je izkoristek ekstrakcije (*recovery*), ki je odvisna od sestave in priprave vzorca ter koncentracije analita. FDA smernica priporoča določanje izkoristka ekstrakcije pri treh koncentracijah čez celotno koncentracijsko območje, pri čemer morajo biti rezultati ponovljivi, natančni in konsistentni. Uspešnost ekstrakcije pri vseh treh izbranih koncentracijskih točkah smo izračunali na osnovi primerjave med izračunano koncentracijo iz enačbe umeritvene premice in dejansko koncentracijo (36,37). Pripravili smo kontrolne vzorce standardnih raztopin CoQ10 s koncentracijami 5, 25, 40 µg/mL v sojinem olju. Rezultat smo podali kot odstotek ujemanja med obema koncentracijama. Določili smo mejo sprejemljivosti 100±5%.

3.4.7 Meja zaznavnosti

Meja zaznavnosti (LOD, Limit of detection) je najnižja koncentracija analita v preiskovanem vzorcu, ki jo lahko zanesljivo zaznamo ločeno od ozadja pri predpisanih eksperimentalnih pogojih, vendar je ne moremo tudi kvantitativno ovrednotiti. Določili smo jo na način, ki temelji na standardnem odklonu vrednosti odsekov na ordinati (σ) in na povprečni vrednosti naklonov umeritvenih premic (S) (36).

$$\text{LOD} = 3,3 \times \sigma / S \quad (\text{enačba 5})$$

3.4.8 Meja določitve

Meja določitve (LOQ, Limit of quantification) je najmanjša koncentracija analita v preiskovanem vzorcu, ki jo pod predpisanimi eksperimentalnimi pogoji lahko kvantitativno ovrednotimo z ustrezno točnostjo in natančnostjo. Izračunali smo jo na podoben način kot mejo zaznavnosti. Izračun meje določitve je naveden v enačbi 6 (36).

$$\text{LOQ} = 10 \times \sigma / S \quad (\text{enačba 6})$$

3.4.9 Stabilnost vzorcev

Spremljali smo stabilnost vzorcev CoQ10 med validacijo v treh zaporednih dnevih. Iste vzorce standardne raztopine CoQ10 s koncentracijo 5, 25, 40 µg/mL smo vsak dan tekom izvajanja validacije metode analizirali s trikratnim injiciranjem. Hoteli smo pokazati, da je analit primeren za analizo v daljšem časovnem intervalu. Rezultat smo podali kot odstotek ujemanja med koncentracijo CoQ10 ob določenem času relativno glede na vrednost ob

času 0. Določili smo, da upad ali porast ne sme biti večji od 5% glede na začetno vrednost odziva CoQ10 pri posamezni koncentraciji.

3.4.10 Robustnost

Robustnost analizne metode je merilo sposobnosti metode, da ostane nespremenjena kljub majhnim, namernim spremembam v parametrih metode. Je pokazatelj zanesljivosti metode med normalno uporabo. Določamo jo tako, da spremenimo enega ali več parametrov (36). V okviru robustnosti smo spremenili pretok; zvišali in znižali za 0,1 mL/min glede na validirano metodo, zvišali T kolone (30 in 35°C), spremenili sestavo MF (ACN: THF: H₂O =50:45:5). Robustnost smo vrednotili kot spremembo resolucije, asimetrije kromatografskih vrhov in števila teoretskih podov. Programska oprema je določila parametre avtomatsko. Sicer se izračunajo po spodnjih enačbah 7,8,9. Analizirali smo vzorec izdelka B, ki je vseboval tako oQ10 kot rQ10, pri čemer sta bila kromatografska vrhova ločena. Rezultate smo podali relativno glede na parametre pri validirani metodi.

Resolucija izraža ustrezno ločbo med dvema komponentama, ki se eluirata najbližje. Običajno je zahtevana vrednost resolucije > 2. Izračunamo jo po enačbi 7.

$$R = 2 (t_2 - t_1) / (w_1 + w_2) \quad (\text{enačba 7})$$

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

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

Asimetrija kromatografskih vrhov

$$T = W_{0,05} / 2f \quad (\text{enačba 8})$$

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

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

Število teoretskih podov

$$N = 16 (t_r / w)^2 \quad (\text{enačba 9})$$

t_r : retencijski čas spojine

w: širina kromatografskega vrha

3.5 OBDELAVA PODATKOV

Za izračun rezultatov in statistično obdelavo podatkov smo uporabili program Excel, del programskega paketa Microsoft Office 2007. Z namenom lažje predstavitve rezultatov smo izdelali preglednice in grafe. Delež CoQ10 v grafih predstavlja vsebnost le-tega v določeni časovni točki glede na koncentracijo ob času 0.

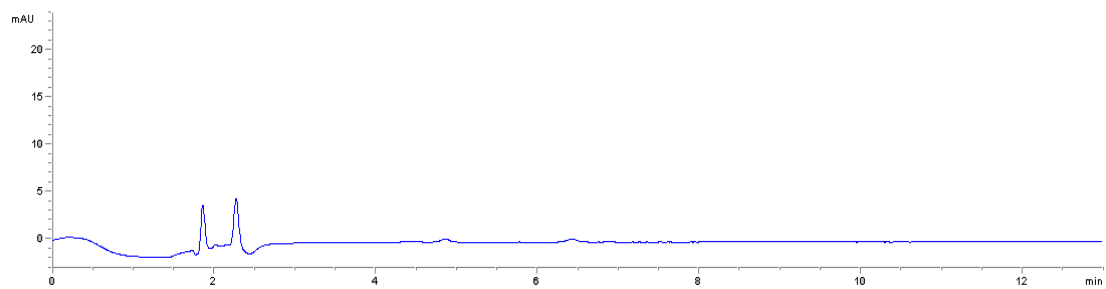
Konstante reakcijske hitrosti oksidativne nestabilnosti CoQ10 za 0. red reakcije smo pridobili iz naklona krivulje vsebnosti CoQ10 v odvisnosti od časa znotraj 2 dni.

4 REZULTATI

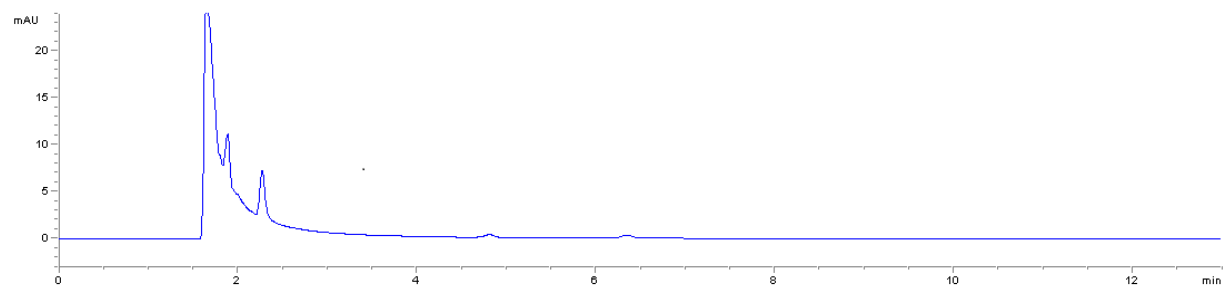
4.1 VREDNOTENJE HPLC METODE

4.1.1 Selektivnost

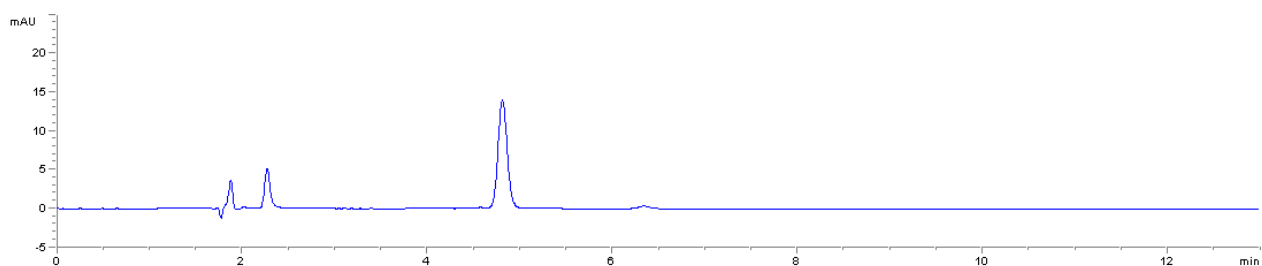
Selektivnost smo opredelili v skladu z metodo 3.4.1.



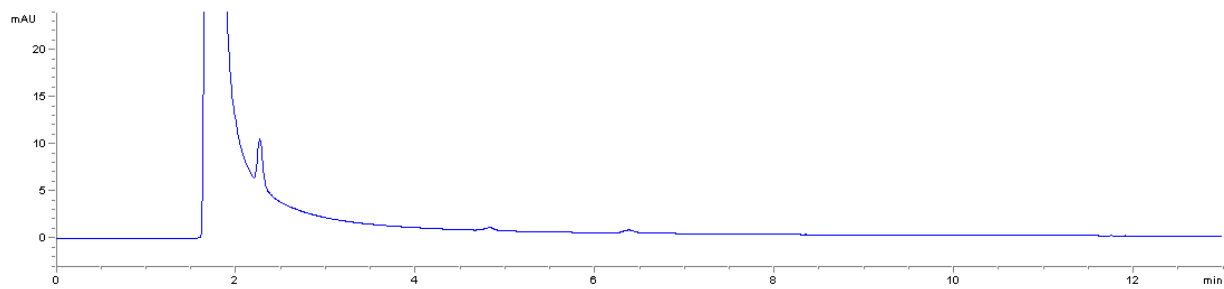
Slika 9: Kromatogram brezvodnega etanola



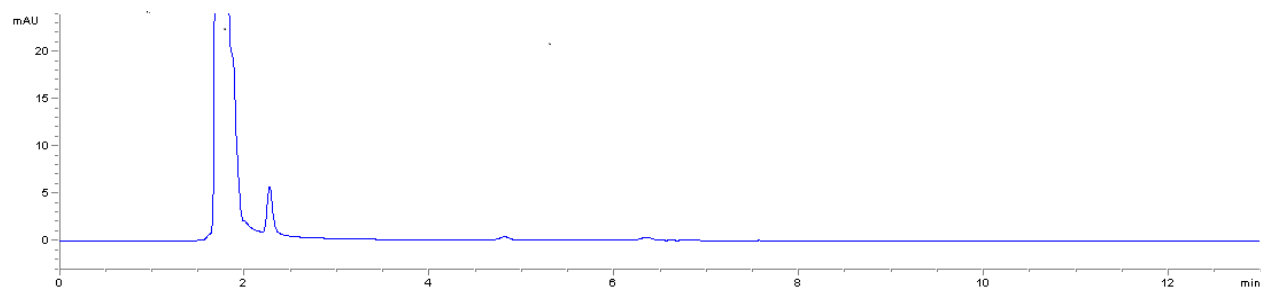
Slika 10: Kromatogram standardne raztopine askorbinske kisline



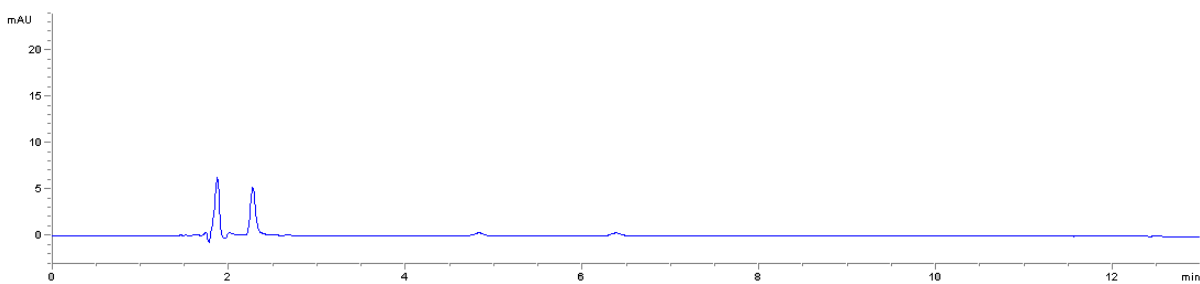
Slika 11: Kromatogram standardne raztopine vitamina E



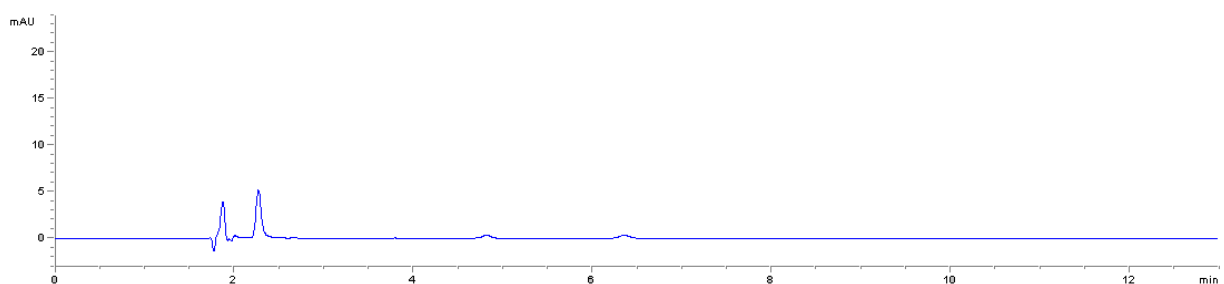
Slika 12: Kromatogram standardne raztopine elagične kisline



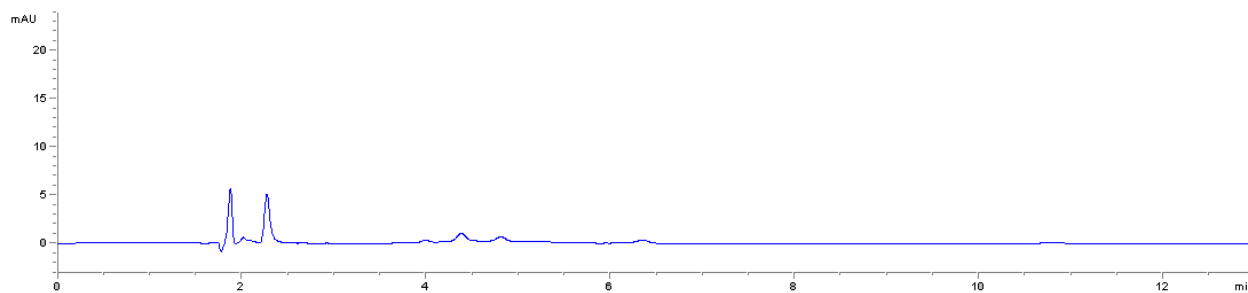
Slika 13: Kromatogram standardne raztopine kvercetina



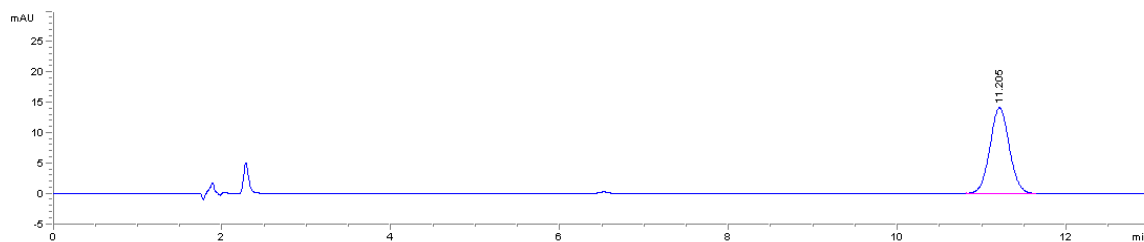
Slika 14: Kromatogram standardne raztopine 1,4-ditiotreitola



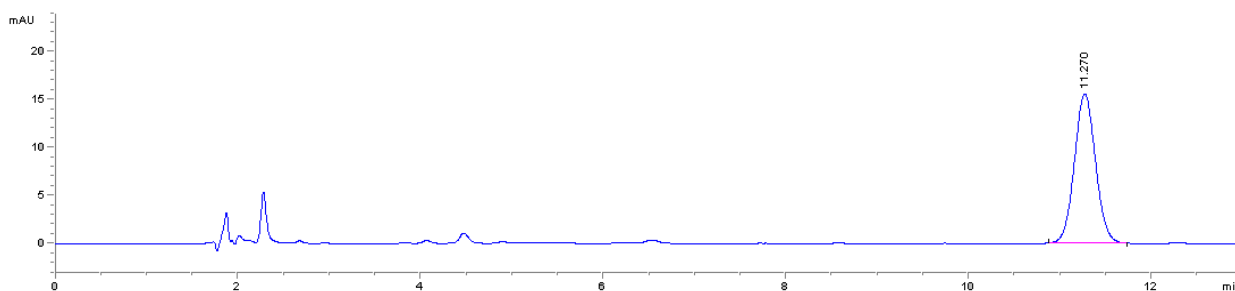
Slika 15: Kromatogram standardne raztopine natrijevega sulfida



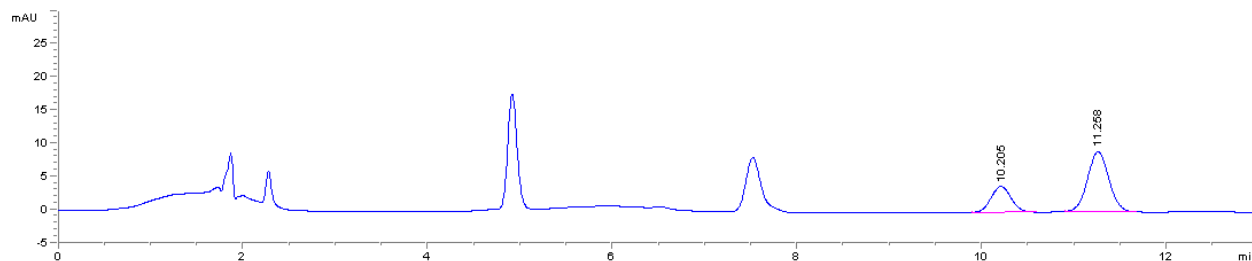
Slika 16: Kromatogram sojinega olja



Slika 17: Kromatogram standardne raztopine oQ10 ($t_r=11,2$ min) v etanolu s koncentracijo $25 \mu\text{g/mL}$



Slika 18: Kromatogram oQ10 ($t_r=11,2$ min) s koncentracijo $25 \mu\text{g/mL}$ v sojinem olju



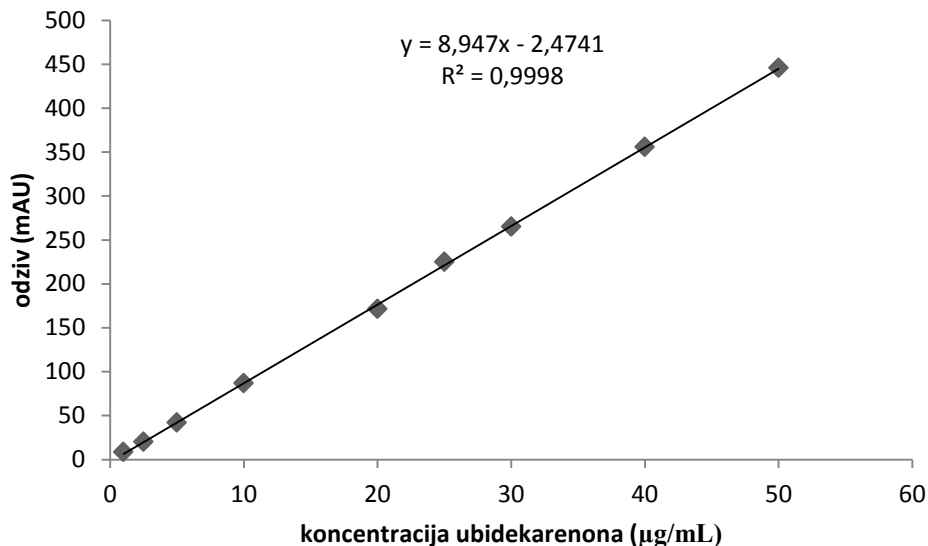
Slika 19: Kromatogram izdelka Fidimed Koencim 10; t_r (rQ10) =10,2 min in t_r (oQ10) =11,3 min

4.1.2 Linearnost

Iz pridobljenih odzivov standardnih raztopin ubidekarena v skladu s postopkom 3.4.2 smo s pomočjo linearne regresije določili umeritveno premico in determinacijski koeficient (R^2). Glede na določeno vrednost determinacijskega koeficienta, lahko potrdimo, da je izbrana metoda linearna v območju koncentracij med 1 in 50 $\mu\text{g/ml}$. R^2 skupaj s pripadajočimi enačbami umeritvenih premic so zbrani v preglednici V in sliki 20.

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

Dan	Enačba premice	R^2
1	$y = 8,9470x - 2,4741$	0,9998
2	$y = 8,9434x - 2,0743$	0,9997
3	$y = 9,1089x - 2,0594$	0,9997
skupno	$y = 8,9998x - 2,2026$	0,9997



Slika 20: Umeritvena premica ubidekarena z metodo HPLC po prvem dnevu

4.1.3 Točnost, ponovljivost

4.1.3.1 Dnevna ponovljivost

Rezultati so bili pridobljeni v skladu s postopkom 3.4.4/5 (Preglednica VI). Pri vseh treh koncentracijah kontrolnih vzorcev je bil RSD odziva največ 1,15%. Odstopanje je nižje od 5%, zato smo lahko potrdili ponovljivost metode. Metoda zagotavlja ustrezno točnost, saj je povprečna vrednost točnosti na intervalu $100 \pm 5\%$. Potrdimo lahko tudi ponovljivost injiciranja, saj je povprečni RSD $0,18\% < 5\%$.

Preglednica VI: Ponovljivost in točnost HPLC metode znotraj enega dneva

Dejanska koncentracija	Povprečje odziva	Odstopanje odziva RSD %	Izračunana koncentracija	Točnost (%)	Ponovljivost injiciranja
5	41,7	1,15	4,93	98,63	0,37
25	221,1	0,18	24,99	99,95	0,13
40	360,0	0,71	40,52	98,71	0,06
povprečna vrednost		0,68		$99,10 \pm 0,74$	0,18

4.1.3.2 Meddnevna ponovljivost

Rezultati so bili pridobljeni v skladu s postopkom 3.4.4/5 (Preglednica VII). Pri določanju meddnevne ponovljivosti je bil pri kontrolnih vzorcih RSD največ 1,51%. Odstopanje je nižje od 5%, zato smo lahko potrdili meddnevno ponovljivost. Metoda zagotavlja tudi meddnevno točnost, saj je povprečna vrednost na intervalu $100 \pm 5\%$.

Preglednica VII: Meddnevna ponovljivost in točnost HPLC metode

Dejanska koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Povprečje odziva	Odstopanje odziva RSD (%)	Izračunana koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Točnost (%)
5	42,20	0,99	4,99	99,85
25	227,50	1,51	25,70	97,19
40	358,30	1,30	40,32	99,19
povprečna vrednost		1,27		$98,74 \pm 1,39$

4.1.4 Izkoristek ekstrakcije

Rezultati so bili pridobljeni v skladu s postopkom 3.4.6 (Preglednica VIII). Izračunano odstopanje od točne vrednosti je manjše od 5%, zato lahko potrdimo, da metoda zagotavlja ustrezno določitev koncentracij CoQ10 v sojinem olju.

Preglednica VIII: Ujemanje koncentracije med deklarirano in določeno vrednostjo v vzorcih z dodatkom standarda CoQ10 v sojinem olju

Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Točnost v sojinem olju (%)
5	98,50
25	98,50
40	98,10
povprečna vrednost	$98,40 \pm 0,23$

4.1.5 Meja zaznavnosti in določitve

V skladu s postopkom 3.4.7 in 3.4.8 smo izračunali mejo zaznavnosti in določitve. Izračunali smo povprečno vrednost naklonov (S) in SD odsekov na ordinati (σ), ki znašata:

$$S=8,9998 \quad \sigma=0,2352$$

Pri izbranih pogojih HPLC metode je meja zaznavnosti ubidekarena 0,086 $\mu\text{g/mL}$. Meja določitve pa znaša 0,26 $\mu\text{g/mL}$.

4.1.6 Stabilnost vzorcev

Spremljali smo stabilnost vzorcev v skladu s postopkom 3.4.9 znotraj treh dni (Preglednica IX).

Preglednica IX: Prikaz stabilnosti kontrolnih vzorcev v časovnem obdobju treh dni

Čas (d)	5µg/mL	25µg/mL	40µg/mL
0	100,00	100,00	100,00
1	100,64	100,70	100,02
2	101,95	102,93	102,29
povprečna vrednost (%)	100,90±1,0	101,20±1,53	100,80±1,31

4.1.7 Robustnost

Rezultati so bili pridobljeni v skladu s postopkom 3.4.10 (Preglednica X).

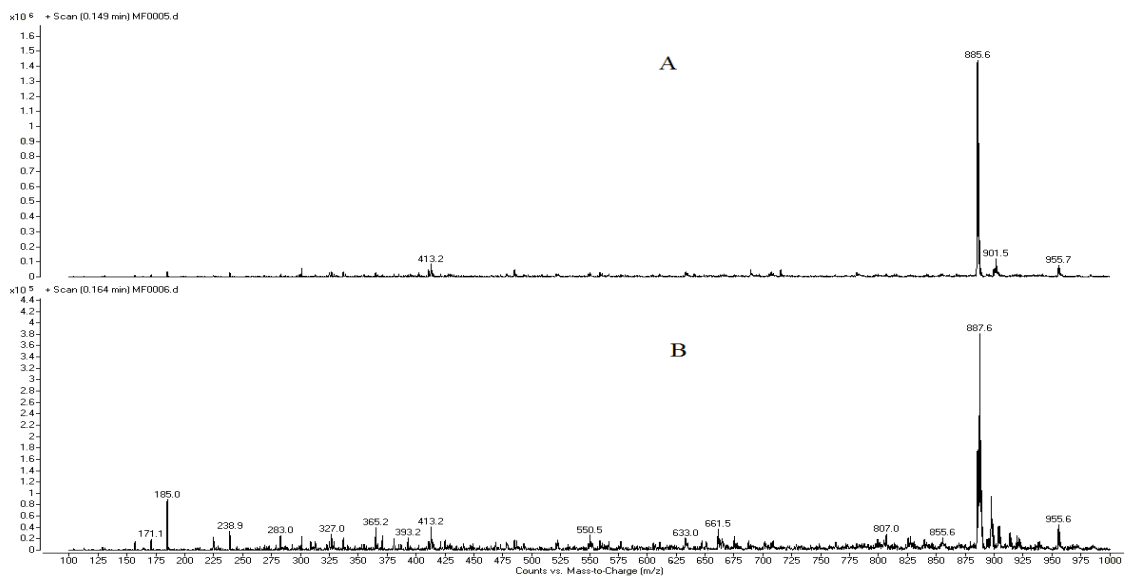
Preglednica X: Prikaz spreminjanja parametrov relativno glede na uporabljene pogoje analize*

Parameter	1,4 mL/min	1,5 [*] mL/min	1,6 mL/min	T kol. 30°C	T kol. 35°C	Sprememba MF
t_r oks. oblike	1,06	1,00	0,92	0,89	0,78	0,58
AUC	1,06	1,00	0,93	1,00	1,07	1,09
sym	1,00	1,00	1,01	1,01	1,03	1,04
N	1,05	1,00	0,97	1,05	1,01	0,87
Rs	0,92	1,00	0,98	1,00	0,95	0,73
t_r reduc. oblike	1,06	1,00	0,92	0,90	0,78	0,59
AUC	1,06	1,00	0,90	1,00	1,00	1,10
sym	1,02	1,00	1,02	1,02	0,94	0,90
N	1,05	1,00	0,98	1,07	1,00	0,85
Rs	0,92	1,00	0,98	1,00	0,95	0,73

N:učinkovitost kolone, R_s: ločitev kromatografskih vrhov oQ10 in rQ10, Sym: asimetrija kromatografskega vrha

4.2 IDENTIFIKACIJA UBIKINOLA Z LC- MS

Rezultate smo pridobili v skladu s postopkom 3.3.2.



Sliki 21 A,B: Masni spekter vzorca B pri t_r (rQ10) = 10,2 min, $[M+Na]^+ = 887,6$ (M oQ10 +22 Da) in t_r (oQ10) = 11,3 min, $[M+Na]^+ = 885,7$ (M rQ10 +23 Da)

Molekulski ion m/z 886 na sliki 21 A predstavlja oQ10, ki je v obliki $[M+Na]^+$, kar se sklada z M_r (oQ10), ki znaša 863 Da. Za predvideno spojino rQ10 pa daje v masnem spektru ionski vrh m/z 888. To potrjuje, da gre za rQ10, ker je masa za 2 Da večja od oQ10, saj namreč rQ10 vsebuje dva dodatna vodikova atoma v primerjavi z oQ10 (Slika 21 B).

4.3 STABILNOST PRIPRAVKOV S CoQ10

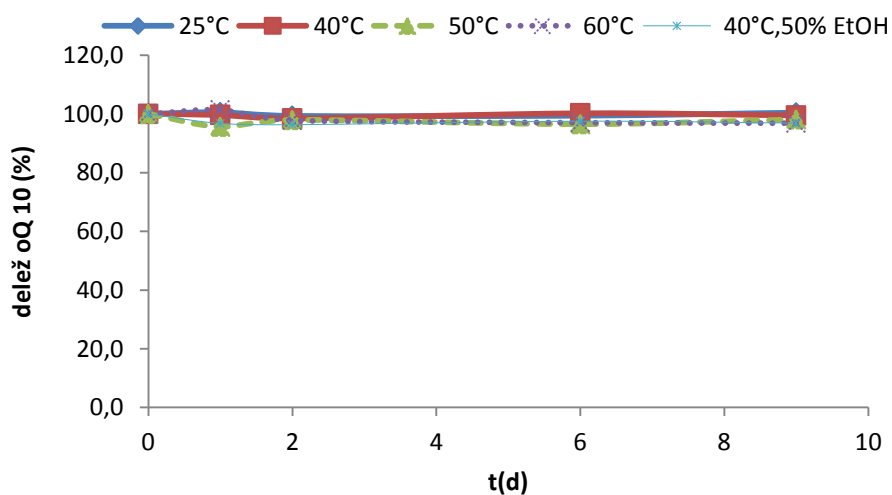
Rezultate smo pridobili v skladu s postopkom 3.3.3 (Preglednica XI). Proučevali smo spreminjanje deleža oQ10 v izdelkih A in B v odvisnosti od časa. Izdelek A je vseboval le oQ10, medtem ko je izdelek B poleg oQ10 vseboval še askorbinsko kislino in vitamin E. Določili smo tudi delež rQ10 v izdelku B, medtem ko je v izdelku A delež rQ10 0 oz. znotraj eksperimentalne napake.

Preglednica XI: Prikaz spreminjanja vsebnosti CoQ10 v izdelku A in B ter deleža rQ10 v izdelku B v odvisnosti od časa

Čas (d)	Delež oQ10 (%) /iz. A	Delež oQ10 (%) /iz. B	Delež rQ10 (%) /iz. B
0	100,0	58,6	41,9
4	100,7	39,7	60,4
7	100,4	33,3	66,7
14	100,5	15,6	84,4
21	100,1	10,7	89,3
42	100,4	4,4	95,7

4.4 STABILNOST STANDARDA CoQ10

V skladu s postopkom 3.3.4 smo spremljali stabilnost oQ10 pri različnih T v brezvodnem etanolu in 50% etanolu (Slika 22).

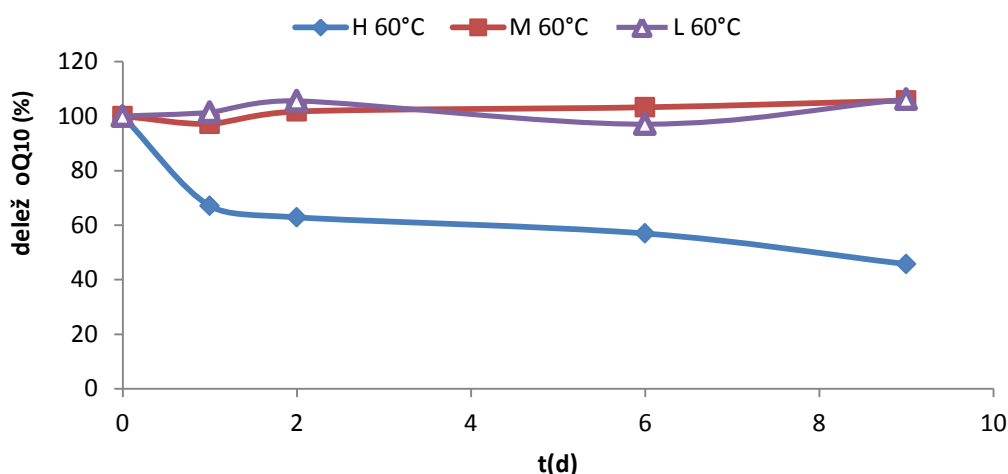


Slika 22: Delež oQ10 v odvisnosti od T in spremembe medija (50% EtOH)

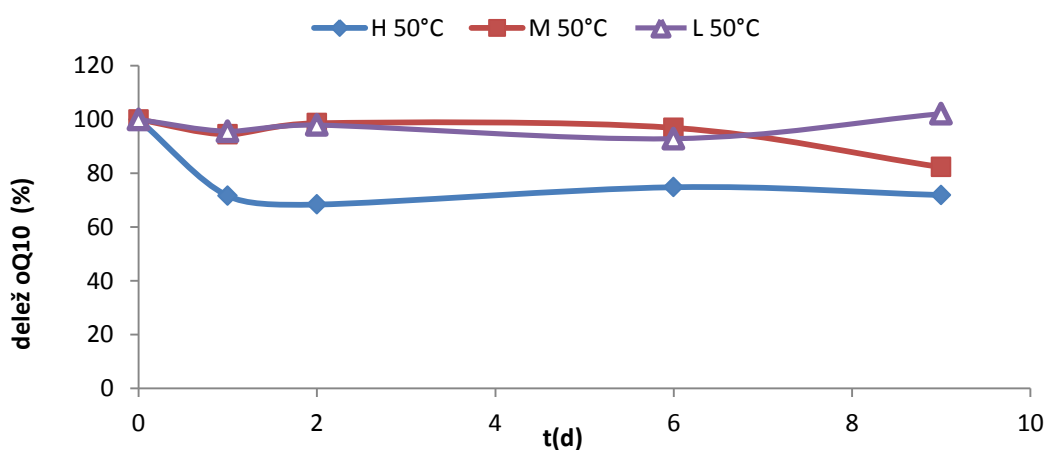
4.5 STABILNOST CoQ10 OB PRISOTNOSTI ASKORBINSKE KISLINE IN OSTALIH ANTIOKSIDANTOV

4.5.1 Dodatek askorbinske kisline pri različnih temperaturah

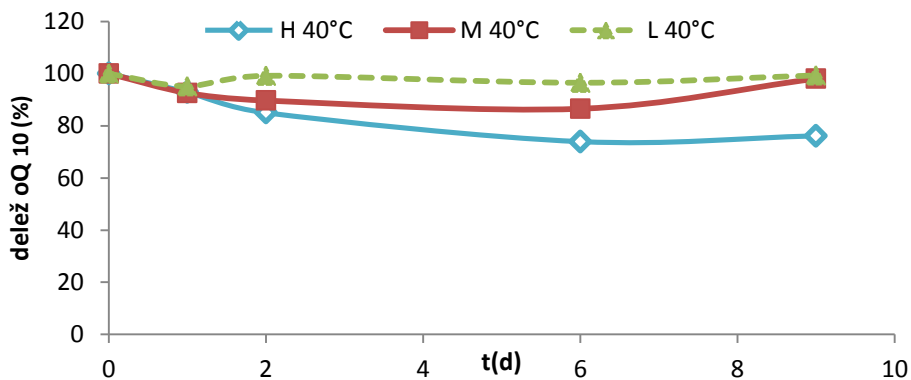
V skladu s postopkom 3.3.5 smo določili vpliv askorbinske kisline na stabilnost CoQ10 pri različnih temperaturah (60,50,40,25°C). Razmerje med CoQ10 in AK je enako kot v prehranskih dopolnilih pri koncentraciji M (67 µg/mL), H je 10x višja v prid AK kot M (670 µg/mL), L pa 10x nižja v prid AK kot M (6,7 µg/mL) (Slike 23-26).



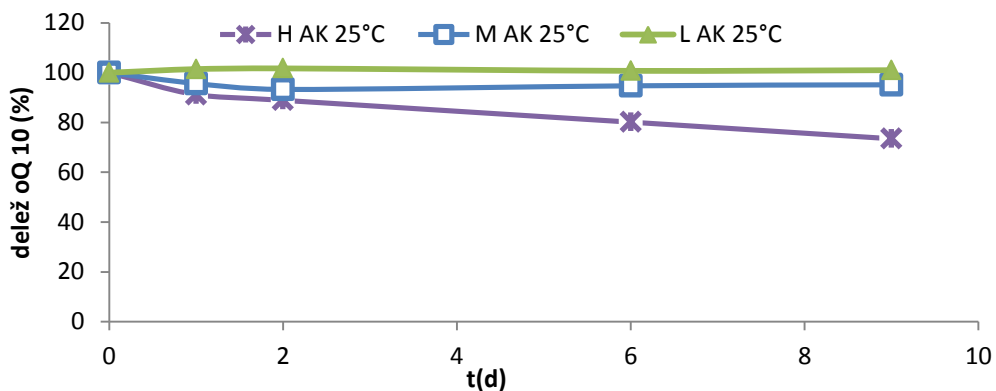
Slika 23: Delež oQ10 ob prisotnosti AK pri 60°C (H: 670 µg/mL, M: 67µg/mL, L: 6,7 µg/mL)



Slika 24: Delež oQ10 ob prisotnosti AK pri 50°C (H: 670 µg/mL, M: 67 µg/mL, L: 6,7 µg/mL)



Slika 25: Delež oQ10 ob prisotnosti AK pri 40°C (H: 670 µg/mL, M: 67 µg/mL, L: 6,7 µg/mL)

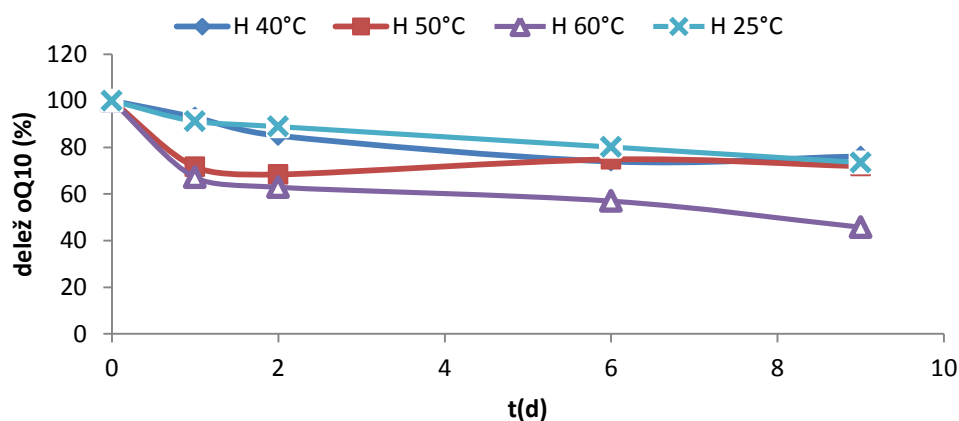


Slika 26: Delež oQ10 ob prisotnosti AK pri 25°C (H: 670 µg/mL, M: 67 µg/mL, L: 6,7 µg/mL)

Primerjava stabilnosti CoQ10 pri različnih T je prikazana v preglednici XII in sliki 27. Rezultate smo pridobili v skladu s postopkom 3.5.

Preglednica XII: Prikaz konstant reakcijskih hitrosti oksidativne nestabilnosti 0.reda ($\mu\text{g/mLd}$) pri različnih T (H-670 $\mu\text{g/mL}$, M-67 $\mu\text{g/mL}$)

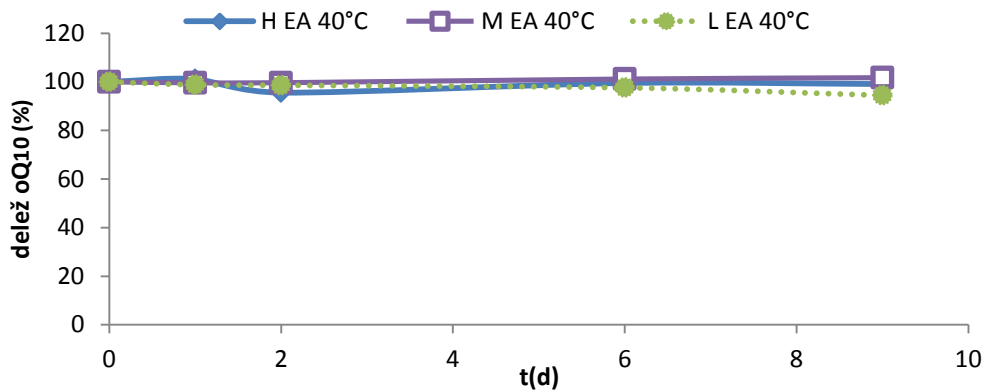
T (°C)	Koncentracija H	Koncentracija M
25	-5,549	-3,354
40	-7,500	-5,1617
50	-15,803	0,1641
60	-18,56	0,8387



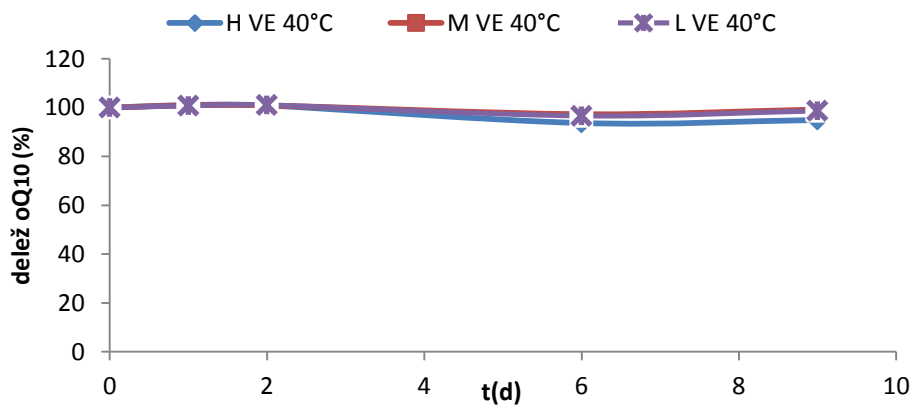
Slika 27: Primerjava deleža oQ10 pri različni T pri najvišji koncentraciji (H: 670 $\mu\text{g/mL}$)
AK

4.5.2 Dodatek ostalih antioksidantov

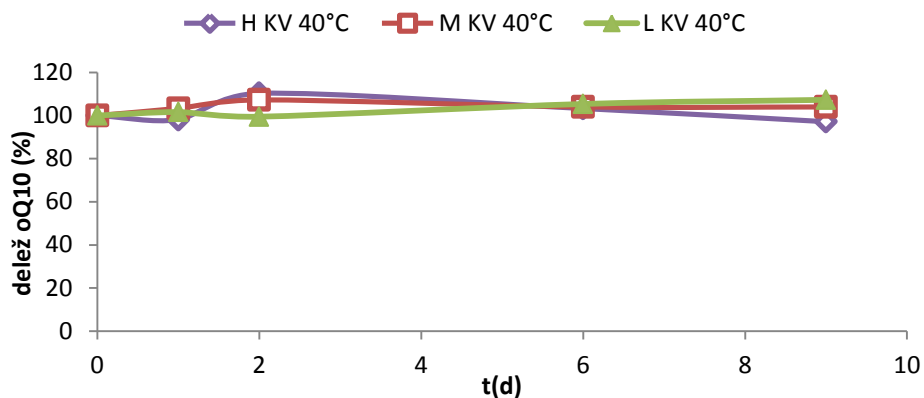
Po metodi 3.3.5 smo proučevali vpliv prisotnosti ostalih antioksidantov (elagične kisline, vitamina E, kvercetina) na upad oQ10 pri 40°C (Slike 28-30).



Slika 28: Delež oQ10 ob dodatku elagične kisline pri 40°C (H: 670 µg/mL, M: 67 µg/mL, L: 6,7 µg/mL)



Slika 29: Delež oQ10 pri 40°C ob dodatku vitamina E (H: 670 µg/mL, M: 67 µg/mL, L: 6,7 µg/mL)

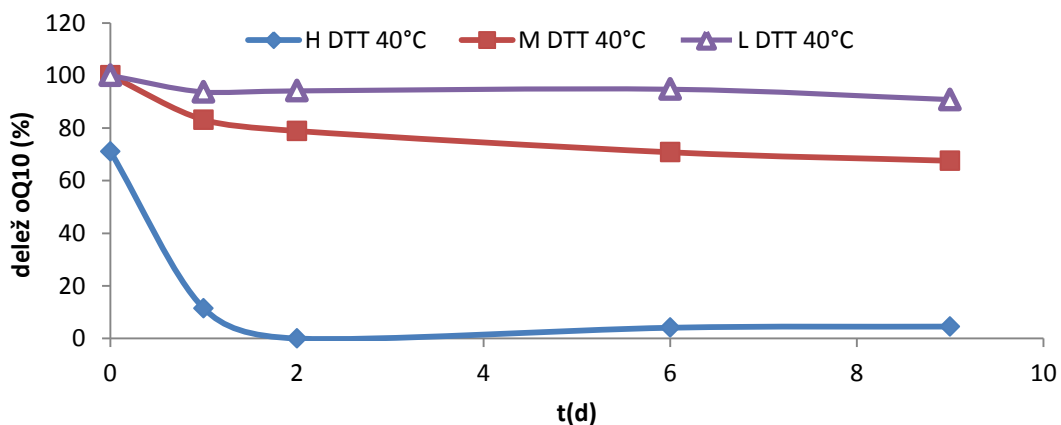


Slika 30: Delež oQ10 pri 40°C ob dodatku kvercetina pri 40°C (H: 670 µg/mL, M: 67 µg/mL, L: 6,7 µg/mL)

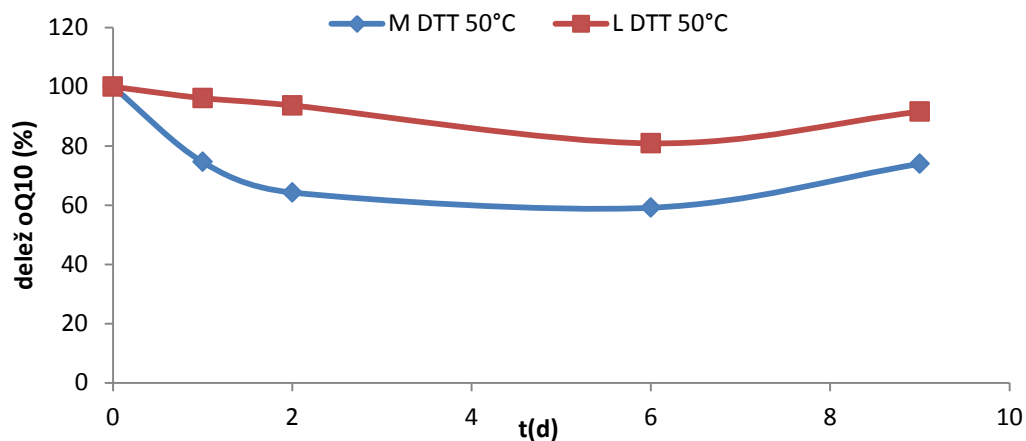
4.6 STABILNOST CoQ10 OB PRISOTNOSTI REDUCENTOV

4.6.1 Dodatek DTT pri različnih temperaturah

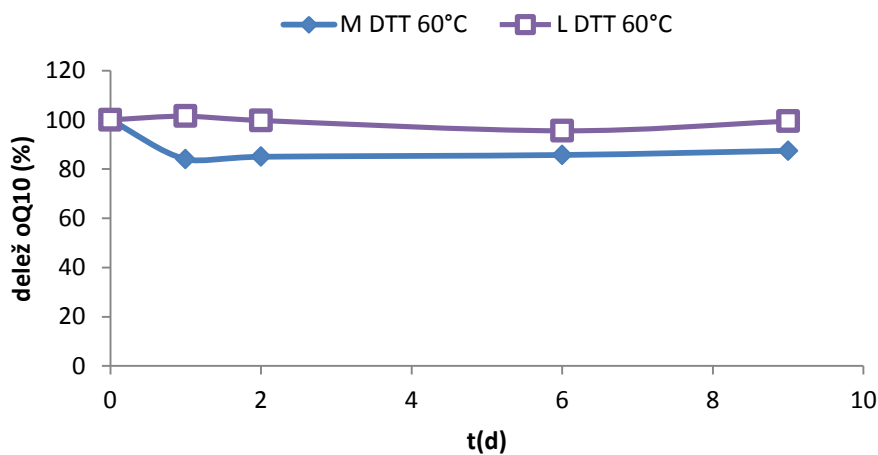
V skladu z metodo 3.3.6.1 smo proučevali vpliv dodanega reducenta DTT na spreminjanje deleža oQ10 pri različnih T (Slike 31-34).



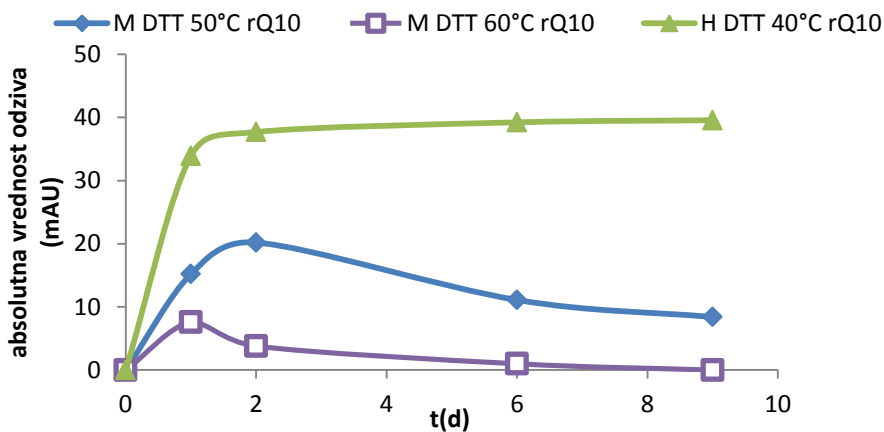
Slika 31: Delež oQ10 ob dodatku DTT pri 40°C (H: 3,8 mM, M: 0,38 mM, L: 0,038 mM)



Slika 32: Delež oQ10 ob dodatku DTT pri 50°C (M: 0,38 mM, L: 0,038 mM)



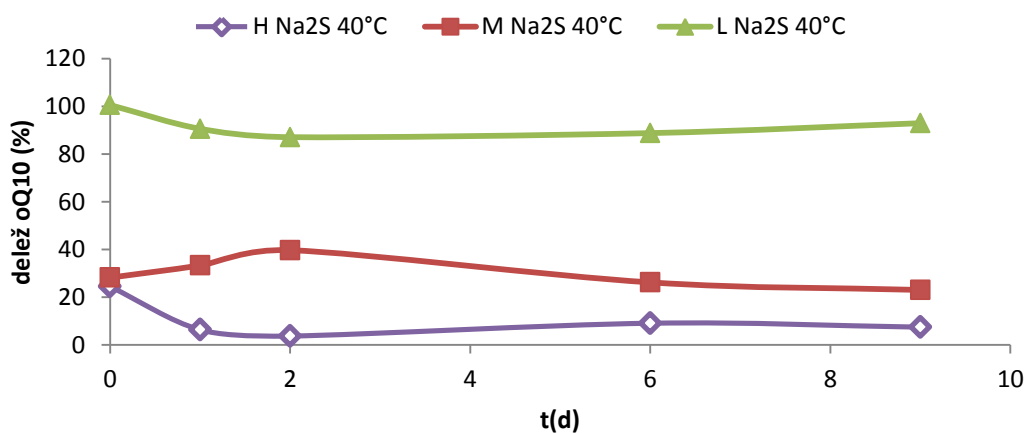
Slika 33: Delež oQ10 ob dodatku DTT pri 60°C (M: 0,38 mM, L: 0,038 mM)



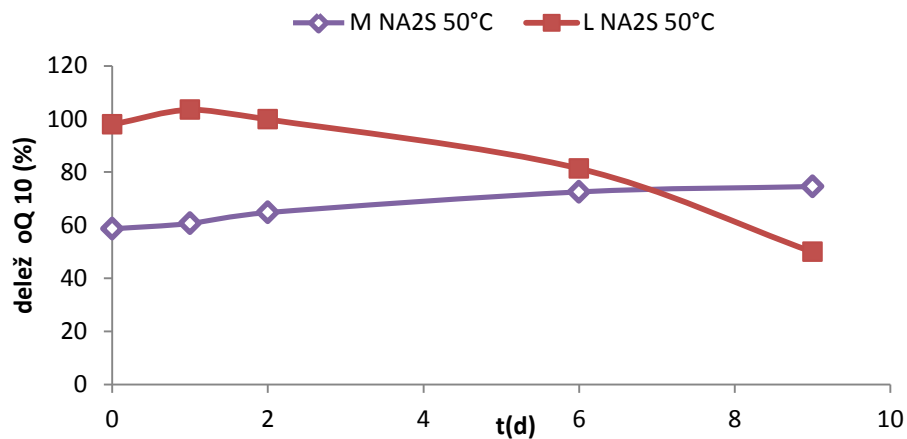
Slika 34: Prikaz nastanka rQ10 ob prisotnosti DTT pri različnih T (H: 3,8 mM, M: 0,38 mM)

4.6.2 Dodatek Na₂S pri različnih temperaturah

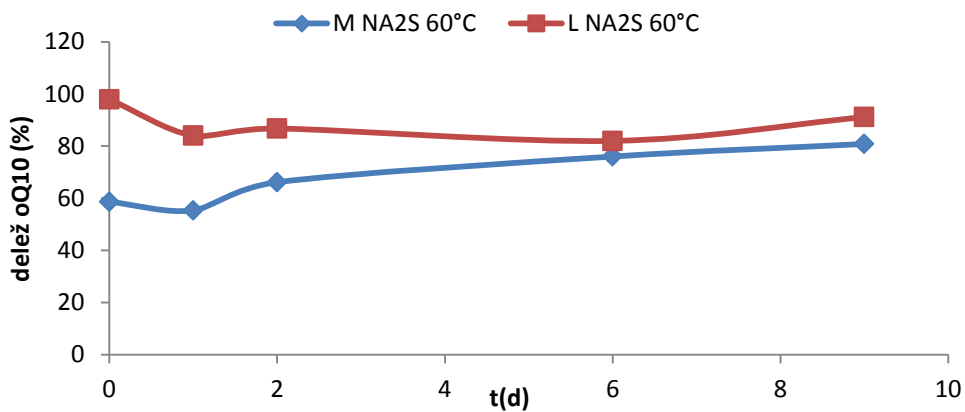
Proučevali smo spreminjanje deleža oQ10 ob prisotnosti Na₂S pri različnih T v skladu s postopkom 3.3.6.1 (Slike 35-40).



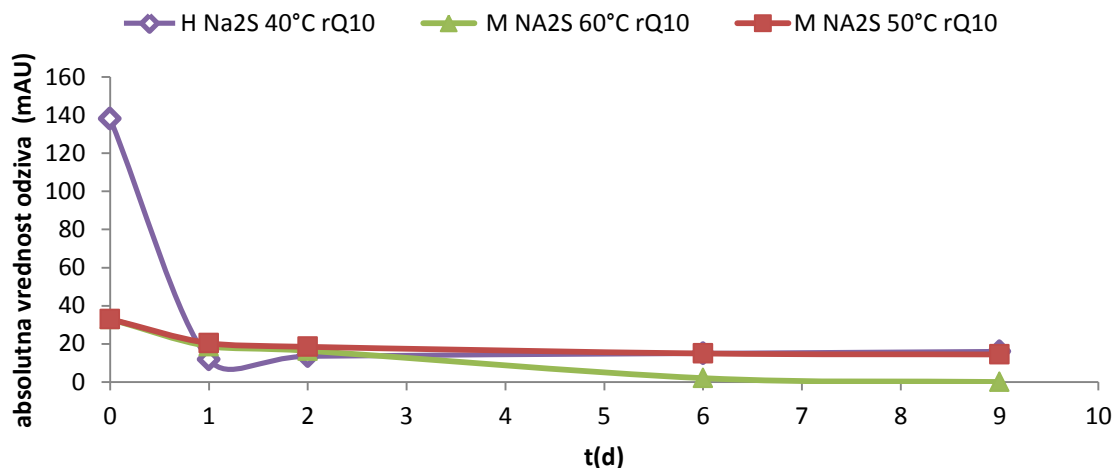
Slika 35: Delež oQ10 ob dodatku Na₂S pri 40°C (H: 3,8 mM, M: 0,38 mM, L: 0,038 mM)



Slika 36: Delež oQ10 ob dodatku Na₂S pri 50°C (M: 0,38 mM, L: 0,038 mM)

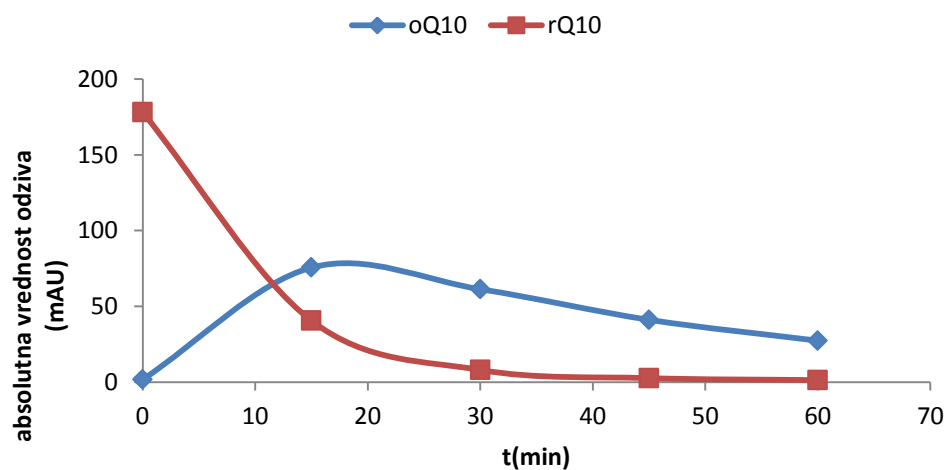


Slika 37: Delež oQ10 ob dodatku Na₂S pri 60°C (M: 0,38 mM, L: 0,038 mM)

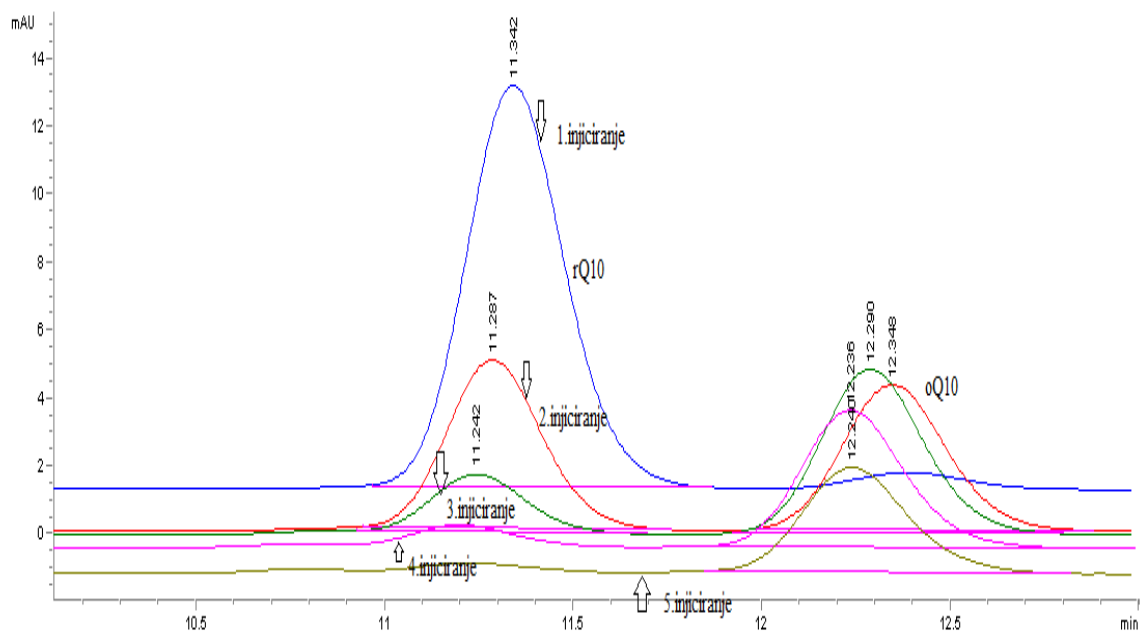


Slika 38: Spreminjanje absolutne vrednosti odziva rQ10 ob prisotnosti Na₂S v odvisnosti od T in koncentracije (H: 3,8 mM, M: 0,38 mM)

Za potrebe spremljanja stabilnosti oQ10 ob prisotnosti Na₂S v krajšem časovnem intervalu smo uporabili avtomatski vzorčevalnik HPLC sistema. Začetnemu porastu rQ10 sledi padec, hkrati narašča oQ10, nato se po določenem času odziva skoraj izenačita (Sliki 39,40).



Slika 39: Spremljanje stabilnosti ob prisotnosti Na₂S s koncentracijo H (3,8 mM) v krajšem časovnem intervalu pri 40°C



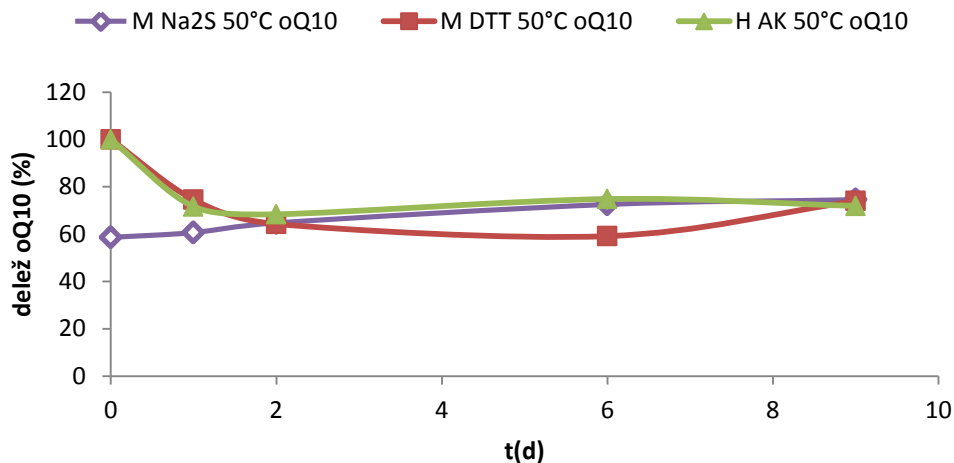
Slika 40: Prekriti kromatogram analiz spremljanja stabilnosti oQ10 v krajšem časovnem intervalu ob prisotnosti Na_2S (injicirali smo v 15 min intervalu)

4.6.3 Dodatek reducirajočih spojin ; HCOOH in Fe^{2+}

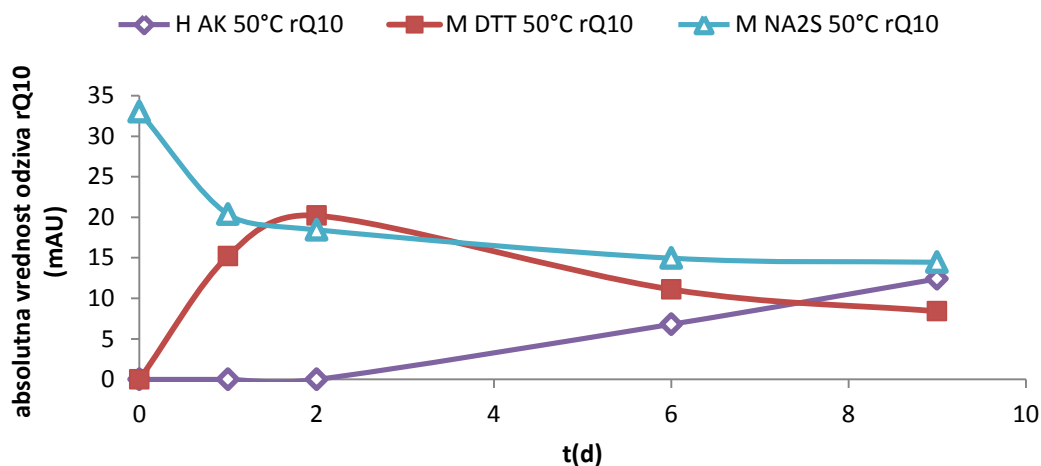
V skladu s postopkom 3.3.6.2 smo na enak način smo pripravili vzorce tudi z HCOOH in Fe^{2+} , vendar ni bilo sprememb v deležu oQ10, saj je CoQ10 stabilen ob prisotnosti teh dveh reducentov v celotnem časovnem intervalu.

4.6.4 Primerjava različnih reducentov na stabilnost oQ10

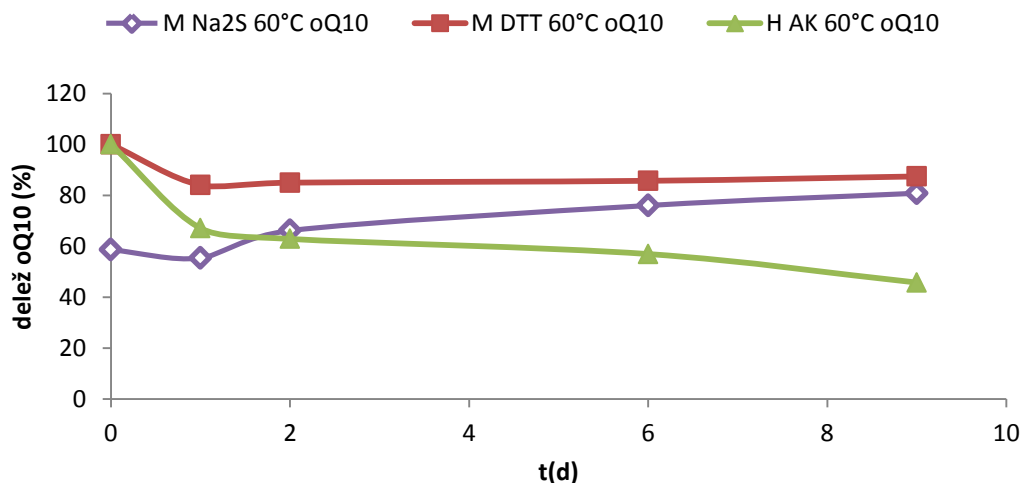
Primerjali smo spreminjanje deleža oQ10 in absolutne vrednosti odziva rQ10 ob prisotnosti treh različnih reducentov pri 50 in 60°C (Slike 41-44).



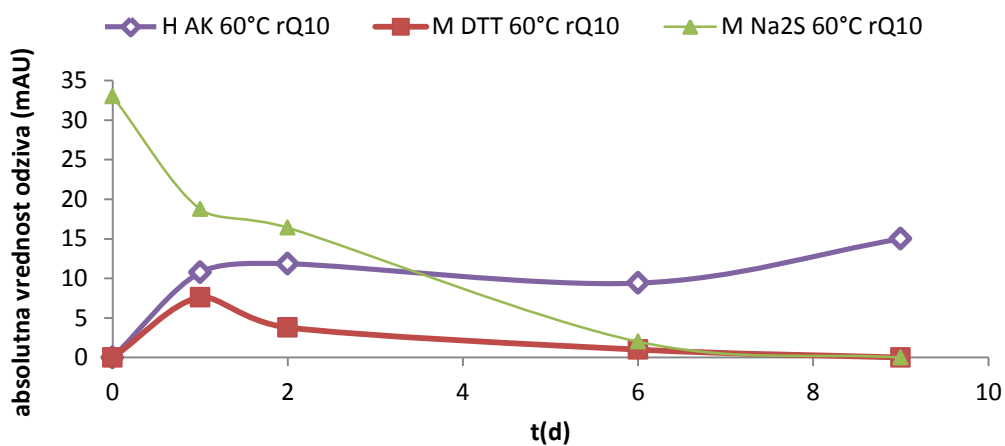
Slika 41: Primerjava deležev oQ10 ob prisotnosti različnih reducentov pri 50°C (M Na₂S, M DTT: 0,38 mM, H AK: 670 µg/mL)



Slika 42: Primerjava absolutne vrednosti odziva rQ10 ob prisotnosti različnih reducentov pri 50°C (M Na₂S, M DTT: 0,38 mM, H AK: 670 µg/mL)



Slika 43: Primerjava deležev oQ10 ob prisotnosti različnih reducentov pri 60°C (M Na₂S, M DTT: 0,38 mM, H AK: 670 µg/mL)

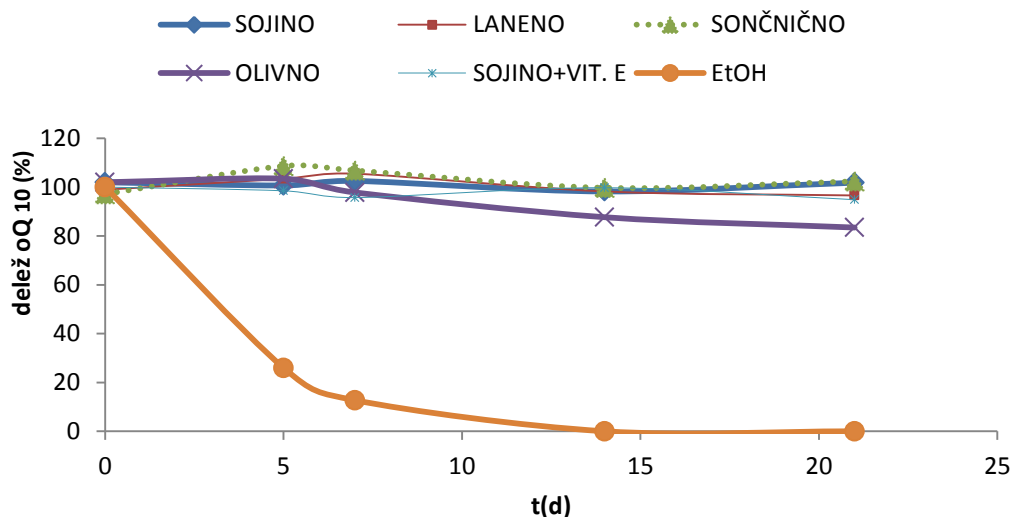


Slika 44: Primerjava absolutne vrednosti odziva rQ10 ob prisotnosti različnih reducentov pri 60°C (M Na₂S, M DTT: 0,38 mM, H AK: 670 µg/mL)

4.7 STABILNOST CoQ10 V RAZLIČNIH MEDIJIH

4.7.1 Stabilnost CoQ10 v rastlinskih oljih

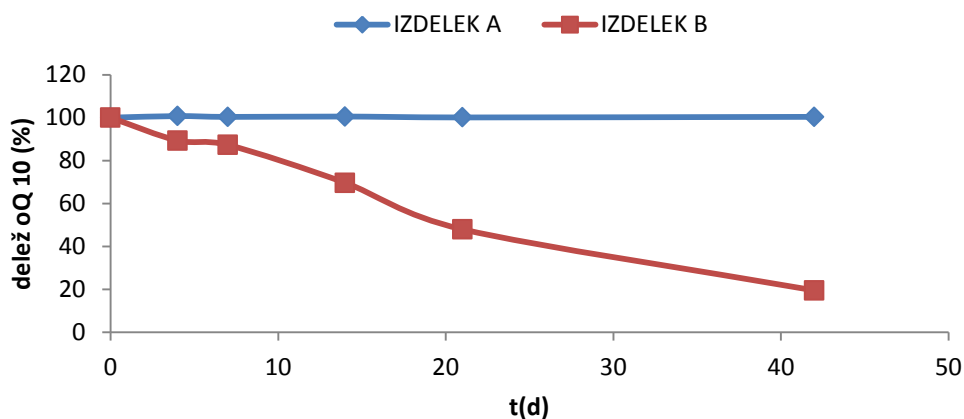
V skladu s postopkom 3.3.6.1 smo proučevali vpliv različnih rastlinskih olj in brezvodnega etanola na stabilnost CoQ10 pri 40°C (Slika 45).



Slika 45: Prikaz stabilnosti CoQ10 v različnih rastlinskih oljih in etanolu pri 40°C

4.7.2 Stabilnost pripravkov s CoQ10

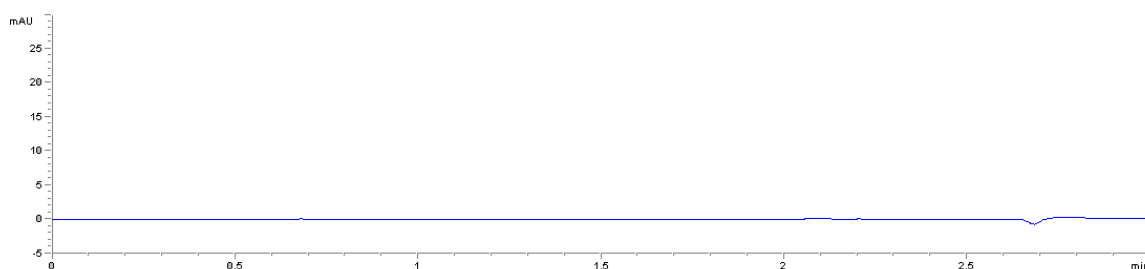
Izdelek A vsebuje le CoQ10, medtem ko izdelek B poleg CoQ10 vsebuje še askorbinsko kislino in vitamin E. Delež oQ10 pri izdelku A se ne spreminja. Pri izdelku B pa delež oQ10 izrazito pada (Slika 46).



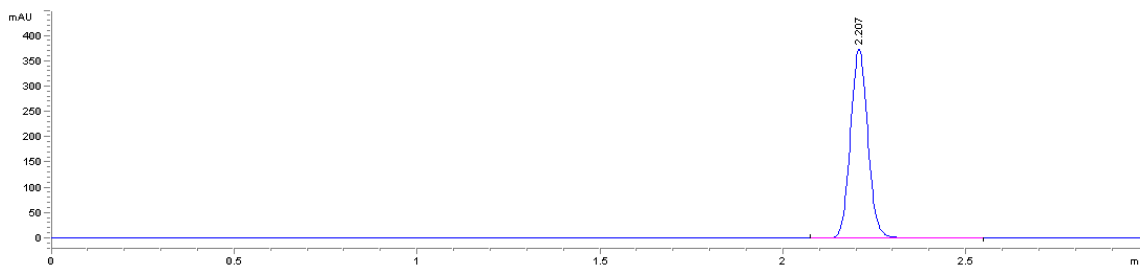
Slika 46: Spreminjanje deleža oQ10 v dveh izbranih izdelkih (izdelek A-Pharma Nord Super Bio-Qinon[®], izdelek B-Fidimed Koencim 10[®])

4.8 STABILNOST ASKORBINSKE KISLINE V RAZLIČNIH MEDIJIH

Za vrednotenje stabilnosti askorbinske kisline smo uporabili drugo metodo HPLC. Za potrditev selektivnosti metode smo posneli kromatogram askorbinske kisline skupaj s slepim vzorcem (Sliki 47,48).

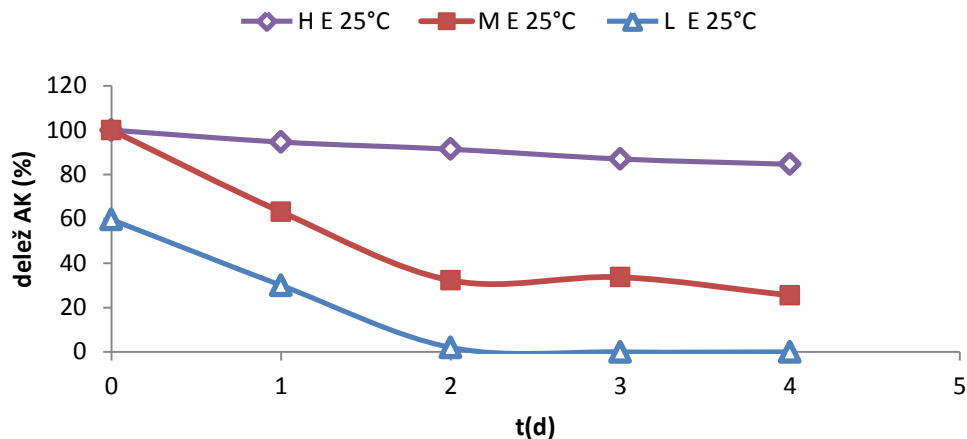


Slika 47: Kromatogram brezvodnega etanola pri proučevanju stabilnosti askorbinske kisline

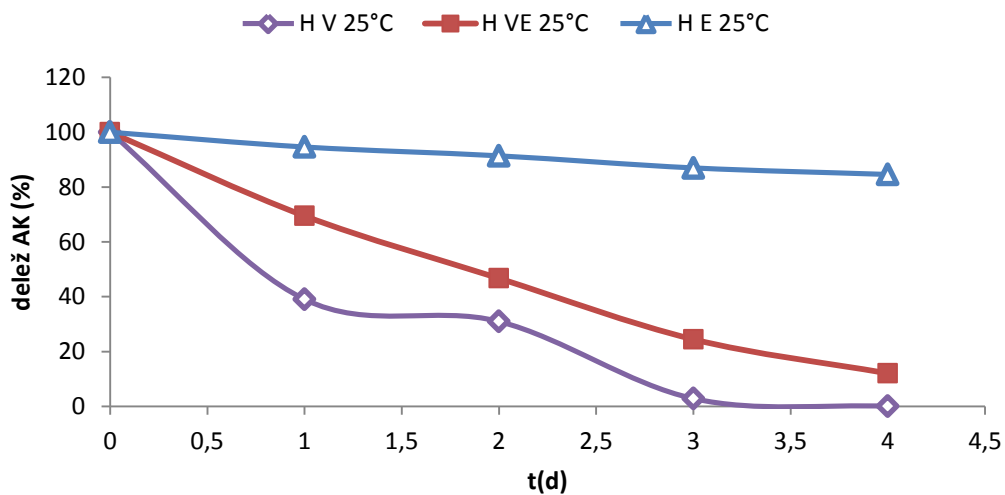


Slika 48: Kromatogram standardne raztopine AK s koncentracijo 670 $\mu\text{g/mL}$ ($t_r = 2,2$ min) za vrednotenje stabilnosti z metodo HPLC

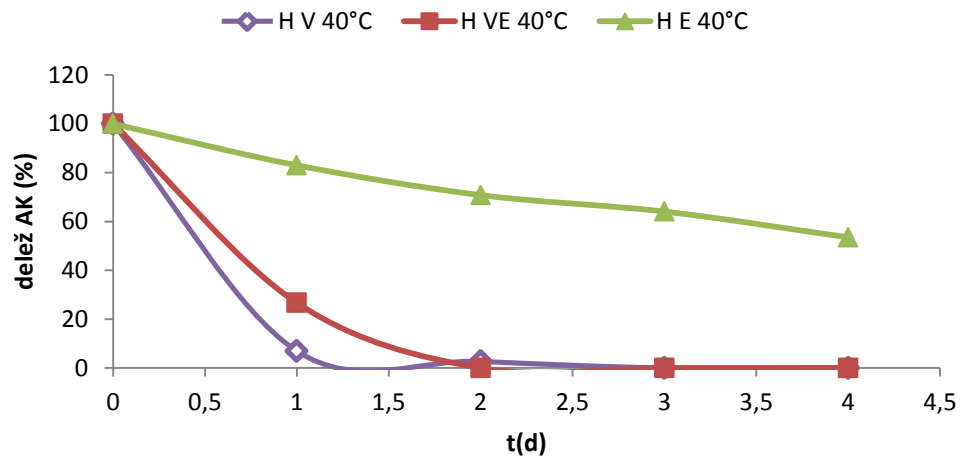
V skladu z metodo 3.3.8. smo proučevali vpliv različnih medijev, koncentracij in T na stabilnost askorbinske kisline (Slike 49-51).



Slika 49: Stabilnost AK v brezvodnem etanolu pri 25°C pri različnih koncentracijah (H: 670 µg/mL, M: 67 µg/mL, L: 6,7 µg/mL)



Slika 50: Stabilnost AK pri 25°C v različnih medijih (V: voda, VE: 50% etanol, E: brezvodni etanol) pri koncentraciji H (670 µg/mL)



Slika 51: Stabilnost AK pri 40°C v treh različnih medijih (V: voda, VE: 50% etanol, E: brezvodni etanol) pri koncentraciji H (670 µg/mL)

5 RAZPRAVA

Na tržišču je danes prisotnih veliko prehranskih dopolnil, ki vsebujejo CoQ10 v različnih oblikah; kristalna oblika CoQ10, oljne suspenzije v različnih rastlinskih oljih, solubilizirana oblika CoQ10 v β -ciklodekstrinih z namenom izboljšanja biološke uporabnosti. Novejši izdelki pa že vsebujejo rQ10 (ubikinol). V organizmu pa vlogo CoQ10 določa redoks ravnotežje med obema oblikama, zato nobena od njiju ni prednostna. Po absorpciji pride do spontane redukcije in tako se v plazmi pojavlja pretežno rQ10.

CoQ10 je edini endogeni lipidotopni antioksidant, ki ga delno zaužijemo s hrano. Ima nenadomestljivo vlogo prenašalca elektronov med kompleksi mitohondrijske dihalne verige. Hkrati je aktivni nosilec protonov prek notranje mitohondrijske membrane in tako sodeluje v procesu sinteze ATP. S staranjem se koncentracije celokupnega CoQ10 zmanjšujejo predvsem v najaktivnejših telesnih organih. Študije kažejo, da ima dodajanje CoQ10 k prehrani pozitiven učinek pri različnih bolezenskih stanjih (sladkorna bolezen, terapija s statini, nevrodegenerativne bolezni). V prehranskih dopolnilih, ki vsebujejo ubikinol lahko pride do previsokega dviga plazemskih koncentracij, saj ima povečan obseg absorpcije v primerjavi z ubikinonom. Ravno zato je potrebna kontrola kakovosti prehranskih dopolnil, da se izognemo neželenim učinkom.

V diplomski nalogi bomo spremljali oksidativno nestabilnost CoQ10, saj smo želeli podrobneje pojasniti upad deleža oQ10 in pojav rQ10 v nekaterih izdelkih, kot je bilo ugotovljeno v predhodni diplomski nalogi (38).

Validacija HPLC metode

Najprej smo preverili uporabnost že razvite analizne metode v namene spremljanja oksidativne stabilnosti CoQ10. Za mobilno fazo smo uporabili acetonitril: tetrahidrofur: voda v razmerju 55:40:5 skupaj z novejšo kolono a z isto stacionarno fazo. Zato smo lahko tudi ugotovili spremembo oz. podaljšanje retencijskega časa za oQ10 v primerjavi s predhodno metodo, ki je bila namenjena vrednotenju vsebnosti oQ10 v mehkih želatinastih kapsulah (38).

V skladu z ICH smernicami za validacijo analizne metode (36) smo preverjali primernost analizne metode za določanje CoQ10 v stabilnostnih študijah. Selektivnost metode smo potrdili iz dobljenih kromatogramov, in sicer smo preverili za vse standarde in medije

uporabljene v stabilnostni študiji, če se morebiti sočasno eliminirajo s CoQ10. Izkazalo se je, da ni bilo v nobenem primeru interferenc z oQ10 (Slika 9-19). Metoda je sposobna tudi kromatografsko ločiti oQ10 od rQ10, ki sta prisotna v izdelku B (Slika 19). Linearnost metode smo potrdili na osnovi R^2 umeritvene premice. Iz rezultatov analiz standardnih raztopin CoQ10 v koncentracijskem območju 1 do 50 μL smo določili enačbe umeritvenih premic in pripadajoče koeficiente korelacije (R^2). Ker je bil $R^2 \geq 0,9997$, lahko potrdimo linearnost (Preglednica V, slika 20). Meja zaznavnosti je 0,086 $\mu\text{g/mL}$. Meja določitve pa znaša 0,26 $\mu\text{g/mL}$ in je nižja od izbranega delovnega območja metode.

Za vrednotenje dnevne, meddnevne ponovljivosti, točnosti in izkoristka ekstrakcije smo izbrali tri kontrolne vzorce na treh koncentracijskih nivojih, ki pokrivajo delovno območje metode. Dnevno ponovljivost meritev standardnih raztopin CoQ10 smo določili s primerjavo stopnje ujemanja odzivov treh paralelek v enem dnevu. RSD med odzivi znotraj dneva je znašal največ 1,15%. Za določitev meddnevne ponovljivosti smo analizirali kontrolne vzorce, pripravljene vsakodnevno skozi tri zaporedne dni. Potrdimo lahko tudi meddnevno točnost, saj je RSD odzivov znašal največ 1,30%. Vrednosti RSD dnevne in meddnevne ponovljivosti so manjše od 5%, zato ustrezajo postavljenim kriterijem sprejemljivosti za ponovljivost. Natančnost injiciranja je prav tako zadovoljiva, saj je povprečni RSD znašal 0,18% (Preglednica VI, VII).

Povprečna dnevna točnost je bila $99,10 \pm 0,74$ in je v intervalu $100 \pm 5\%$ kar ustreza postavljenim kriterijem sprejemljivosti. Potrdimo lahko tudi meddnevno točnost, saj je povprečna vrednost $98,74 \pm 1,39$ (Preglednica VI, VII). Vrednotili smo tudi izkoristek ekstrakcije v sojinem olju s standardnim dodatkom standarda CoQ10. Maksimalno odstopanje od dejanske vrednosti je bilo 1,90%, kar ustreza 5% meji sprejemljivosti in potrjuje ustreznost metode za spremljanje stabilnosti CoQ10 v oljih (Preglednica VIII).

Potrdili smo tudi stabilnost vzorcev med analizo, saj se koncentracija kontrolnih vzorcev ni spremenila za več kot 5%, in sicer je bilo najvišje odstopanje 2,93%. Vzorci nakazujejo trend rahlega porasta vsebnosti CoQ10, vendar so primerni za analizo znotraj 3 dni (Preglednica IX).

Robustnost metode smo preverili s spreminjanjem nekaterih parametrov; pretoka mobilne faze, T kolone in sestave mobilne faze. V ta namen smo analizirali vzorec izdelka B, ki je vseboval tako reducirano kot oksidirano obliko CoQ10. Logično se je z višanjem pretoka

mobilne faze t_r skrajšal oz. obratno pri znižanju pretoka. Posledično se je odziv pri povišanem pretoku nekoliko zmanjšal zaradi hitrejšega prehoda analita skozi detektorski sistem. Med ključnimi parametri kromatografske učinkovitosti se je najmanj spremenila asimetrija kromatografskih vrhov pri oQ10 kot tudi pri rQ10, le pri temperaturi kolone 35°C in spremenjeni MF je bilo razmerje vrednosti odziva nekoliko nižje glede na predlagane analize pogoje. Učinkovitost kolone se je zmanjšala le pri spremenjeni sestavi MF zaradi večje polarnosti mobilne faze. Resolucija oz. ločitev kromatografskih vrhov je bila bistveno nižja le pri spremenjeni MF. Parametri kromatografske učinkovitosti se niso značilno spremenili, zato smatramo, da je analizna metoda robustna (Preglednica X). Vsi parametri vrednotenja analize metode so ustrezni, saj so znotraj postavljenih meja, zato lahko potrdimo primernost metode za kvantitativno določanje CoQ10 v stabilnostni študiji.

Pri našem delu nismo imeli na voljo standarda ubikinola, ker ni komercialno dostopen. Zato smo najprej z metodo tekočinske kromatografije sklopljene z masnim spektrometrom (LC-MS) preverili identiteto kromatografskega vrha $t_r=10,2$ min, za katerega smo posredno sklepali, da pripada rQ10, v skladu s pogoji analize metode opisane v poglavju 3.3.2. Uporabili smo »scan« način v območju m/z 100-1000 v pozitivnem načinu ionizacije. Za ta namen smo analizirali vzorec izdelka B, ki je vseboval tako spojino neznane identitete (verjetno rQ10) kot tudi oQ10. Oba kromatografska vrhova smo neposredno iz HPLC sistema lovili v posamezno vialo in analizirali z LC/MS sistemom. Na osnovi masnega spektra neznane spojine lahko potrdimo, da pripada ubikinolu, saj daje molekularni ion m/z 887,6, ki pripada ubikinolu (rQ10). Ta vsebuje dodatna dva vodikova atoma v primerjavi z ubikinonom in to je v skladu z molekularnim ionom ubikinona (m/z 885,6), saj je razlika mase za 2 Da. V obeh primerih gre za adukt z Na^+ ionom $[\text{M} + \text{Na}]^+$, zato sta obe masi višji za 23 Da v primerjavi z molekularno maso ubikinola oz. ubikinona (865 oz. 863 Da) (Slika 21).

Stabilnost pripravkov s CoQ10 in standarda CoQ10

Osrednji del naše naloge je predstavljal proučevanje oksidativne nestabilnosti CoQ10 pri izbranih pogojih. Želeli smo podrobneje proučiti spreminjanje deleža oQ10 v odvisnosti od časa in temperaturne obremenitve, zato smo najprej izbrali dva izdelka prehranskih dopolnil, pri čemer je eden poleg CoQ10 vseboval askorbinsko kislino in vitamin E, drugi pa ne in jih postavili za 6 tednov v klimatsko komoro pri 40°C in relativni vlažnosti 75%. Tedensko smo vzorčili, kot je opisano v poglavju 3.3.3 Stabilnost pripravkov s CoQ10 in

vrednotili oQ10 z metodo HPLC. Ugotovili smo izrazit upad deleža oQ10 pri izdelku B in posledično naraščanje deleža rQ10, kar je primerljivo z rezultati predhodne diplomske naloge (38) (Preglednica XI, slika 46). Iz tega lahko zaključimo, da je oQ10 v izdelku A konstantna in ustrezne kakovosti skozi daljši čas. Ker izdelek B vsebuje poleg CoQ10 tudi askorbinsko kislino, predvidevamo, da je ta odgovorna za redukcijo CoQ10.

V nadaljevanju smo najprej spremljali stabilnost standarda CoQ10 pri različnih temperaturah (25, 40, 50, 60°C) v brezvodnem etanolu. Preverili smo tudi stabilnost standarda CoQ10 pri 40°C v 50% etanolu. Iz slike 22 je razvidno, da je CoQ10 stabilen pri vseh izbranih temperaturah, saj se je delež oQ10 le minimalno spreminjal.

Stabilnost CoQ10 ob prisotnosti askorbinske kisline in ostalih antioksidantov

V mnogih prehranskih dopolnilih na tržišču je poleg CoQ10 dodana AK kot dodatni antioksidant. Zanj je značilno, da deluje kot redoks stabilizator in zaradi nižjega redoks potenciala zaščiti druge spojine pred oksidacijo. Ravno zato bi bila verjetno sposobna reducirati tudi CoQ10. Ker smo predhodno ugotovili izrazit upad deleža oQ10 v izdelku B, smo v nadaljevanju podrobneje proučevali stabilnost CoQ10 ob prisotnosti AK, kasneje pa tudi drugih izbranih antioksidantov. Kot je opisano v poglavju 3.3.5 Stabilnost CoQ10 ob prisotnosti askorbinske kisline in ostalih antioksidantov smo spremljali delež oQ10 pri različnih T (25, 40, 50, 60°C) v odvisnosti od časa. Pri 25°C se je delež oQ10 pri najvišji koncentraciji dodane askorbinske kisline (H, 670 µg/mL), ki je 10x višja od koncentracije v prehranskih dopolnilih, zmanjšal za 20%, kar kaže na trend upadanja deleža oQ10 ob prisotnosti AK. Pri srednji in najnižji koncentraciji (M, L) se delež ni spreminjal (Slika 26). Podobno kot pri 25°C se je pri 40°C pri koncentraciji H delež oQ10 po devetih dneh zmanjšal za približno 20%, medtem ko se pri M in L delež ni veliko spremenil (Slika 25). Majhna nihanja so najverjetneje posledica eksperimentalne napake ali pa izhlapevanja brezvodnega etanola, kar je povzročilo porast koncentracije oQ10. Podoben trend je opazen tudi pri 50 in 60°C. Z dvigom temperature na 50°C se je delež po 9 dneh zmanjšal za 28%, pri 60°C pa za 55% (Sliki 23,24). Iz primerjave stabilnosti oQ10 ob dodatku askorbinske kisline pri različnih temperaturah lahko sklepamo, da ima T odločilen vpliv na reakcijo redukcije oQ10, saj z dvigom T pada delež oQ10, a le pri najvišji koncentraciji AK (Slika 27). Vpliv temperature na hitrost reakcije redukcije oQ10 smo vrednotili tudi z določanjem konstante reakcijske hitrosti te reakcije po 0. redu. Z dvigom temperature se je konstanta reakcijske hitrosti pri koncentraciji H povečevala, pri 50°C skoraj za 3x glede

na vrednost pri 25°C in je znašala $-15,80 \mu\text{g}/\text{mL d}^{-1}$, kot tudi pri 60°C in je znašala $-18,56 \text{ d}^{-1}$ (Preglednica XII). Konstante pri koncentraciji M so nižje, kar kaže na počasnejši potek reakcije. Na osnovi konstant reakcijske hitrosti smo preverili tudi Arrheniusovo odvisnost hitrosti redukcije od recipročne absolutne temperature. Zaradi počasnejše reakcije pri koncentraciji M je bila možna napoved le pri koncentraciji H. Arrheniusova enačba ni najbolj primerna za temperaturno odvisnost oksidativne nestabilnosti CoQ10, saj je bil R^2 0,92.

Sklepamo lahko, da koncentracija AK bistveno vpliva na hitrost razpada in s tem povezano zmanjševanje deleža oQ10. Z višanjem T se poveča hitrost reakcije, kar je vidno iz naraščanja vrednosti konstant hitrosti, kot tudi upadanja deleža oQ10, ki je najbolj vidna le pri koncentraciji H. Pri najnižji koncentraciji L ni bilo vpliva temperature na delež oQ10 v raztopinah vzorcev z brezvodnim etanolom.

Zanimalo nas je tudi, ali so drugi antioksidanti, ki so pogosto prisotni v prehranskih dopolnilih, sposobni reducirati CoQ10. Zato smo v nadaljevanju spremljali nestabilnost oQ10 ob prisotnosti izbranih antioksidantov (elagična kislina, vitamin E, kvercetin) pri 40°C na enak način kot v primeru dodatka AK. Dodatek elagične kisline ni vplival na nestabilnost CoQ10, saj se delež oQ10 ni spreminjal pri nobeni od treh koncentracij (Slika 28). Tudi ob prisotnosti vitamina E in kvercetina se delež oQ10 ni spreminjal. Majhna nihanja v deležu oQ10 so najverjetneje posledica izhlapevanja topila (Sliki 29,30).

Stabilnost CoQ10 ob prisotnosti reducentov

Glede na to, da prisotnost AK pomembno vpliva na oksidativno nestabilnost oQ10 smo se odločili, preverimo še nekatere reducente. Izbrali smo DTT, kot predstavnika tiolov, Na_2S kot predstavnika skupine sulfidov in reducirajoči spojini (HCOOH in Fe^{2+}).

Spremljanje nestabilnosti oQ10 v prisotnosti reducentov smo izvedli na enak način kot je opisano v poglavju 3.3.5 Stabilnost CoQ10 ob prisotnosti askorbinske kisline in ostalih antioksidantov. Pri koncentraciji H dodanega DTT se je že na začetku delež oQ10 znašal 71%, po 2 dneh je bila v vzorcu prisotna le rQ10, nato pa se ta ponovno oksidirala in po 9 dneh je delež oQ10 ponovno narastel na 4,5%. Hkrati pa je nastala rQ10, in sicer že takoj na začetku. Pri koncentraciji M je delež oQ10 po 9. dneh pa za 33%, pri koncentraciji L za 11% (Slika 31). Kot lahko razberemo iz slike 31, koncentracija dodanega reducenta DTT v vzorce bistveno vpliva na zmanjšanje deleža oQ10. Vpliv na oksidativno

nestabilnost oQ10 smo preverili tudi pri 50 in 60°C, a le pri srednji in najnižji koncentraciji, saj pri najvišji koncentraciji reakcija prehitro poteka že pri 40°C. Dvig temperature na 50 in 60°C ni pospešil hitrosti reakcije redukcije oQ10 (Sliki 32, 33), saj je opazen največji upad pri koncentraciji H pri 40°C. Hitrost reakcije za srednjo in nižjo koncentracijo pri 40°C je primerljiva s hitrostjo pri povišanih temperaturah, po 9 dneh je pri koncentraciji M prisotno še 75%, (50°C) in 88% (60°C) začetne oQ10. Če primerjamo vrednosti odziva rQ10 je razvidno, da je največ rQ10 nastalo pri najvišji koncentraciji prisotnega DTT (Slika 34). In sicer je nastalo največ rQ10 pri koncentraciji H pri 40°C že takoj na začetku, nato se vsebnost oQ10 ni več spreminjala s časom. Pri 50 in 60°C pri koncentraciji M pa je nastalo manj rQ10 in je ta pričela s časom hitro upadati (Slika 34). Iz rezultatov sklepamo, da ima ravno koncentracija reducenta odločilen vpliv na nastanek rQ10.

Na enak način kot pri reducentu DTT smo najprej vrednotili oksidativno nestabilnost oQ10 ob prisotnosti Na₂S pri 40°C. V tem primeru se je delež oQ10 zelo hitro zniževal, še posebej pri koncentraciji H, saj je že ob času 0 delež znašal 24%, po 9. dneh pa le 7,5%. Pri koncentraciji M se je po začetnem padcu na 28% delež le malo spreminjal, pri L pa ni bilo sprememb (Slika 35).

Enako kot pri DTT smo v primeru Na₂S vrednotili nestabilnost oQ10 pri 50 in 60°C pri srednji in najnižji koncentraciji (Sliki 36, 37). Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da ob prisotnosti Na₂S dvig T ne pospeši nastanka reducirane oblike. Ključni element, ki vpliva na proces redukcije oQ10 je v tem primeru koncentracija Na₂S, saj največ rQ10 nastane pri H pri 40°C (Slika 38). Zaradi nizke vsebnosti deleža oQ10 že v začetni časovni točki smo se odločili za spremljanje stabilnosti v krajšem časovnem intervalu z namenom dobiti širši vpogled v proces proučevane reakcije. Zato smo stabilnost vzorcev CoQ10 ob dodatku najvišje koncentracije Na₂S proučevali v krajših časovnih intervalih (na 15 min), kar nam dovoljuje HPLC metoda. Za te potrebe smo uporabili avtomatski vzorčevalnik HPLC sistema z nadzorovano T (40°C). Ob prisotnosti Na₂S je potekla redukcija oQ10 do rQ10 takoj, potem pa je vsebnost rQ10 hitro padala in po 45 min dosegla vrednost 0. Vsebnost oQ10 pa je hitro narasla do časovne točke 15 min, kar je posledica ponovne pretvorbe rQ10 v oQ10. Kasneje pa je vsebnost oQ10 začela počasi padati (Sliki 39, 40). Pri dodatku ostalih dveh reducirajočih spojin; Fe²⁺ in HCOOH se delež oQ10 ni spremenil, saj sta verjetno prešibka reducenta.

Na osnovi dobljenih rezultatov za AK, DTT in Na₂S smo nato primerjali sposobnost redukcije CoQ10 pri 50 in 60°C pri koncentracijah M Na₂S, M DTT in H AK. AK je bila vključena s koncentracijo H, saj je bila koncentracija M prenizka za redukcijo CoQ10. Iz primerjave (Slika 41) je razvidno, da je pri 50°C najmočnejši reducent Na₂S, ki mu sledi DTT. AK pa je najšibkejši reducent, saj ob njeni prisotnosti prične nastajati rQ10 po 2 dneh in v precej manjšem obsegu kot pri ostalih dveh (Slika 42). Podoben trend je opazen tudi pri 60°C (Sliki 43,44).

Stabilnost CoQ10 v rastlinskih oljih

V mnogih prehranskih dopolnilih je CoQ10 v obliki oljne suspenzije v želatinastih kapsulah. Najpogostejša so naslednja olja; sojino, sončnično, olivno, laneno, zato smo se odločili spremljati tudi nestabilnost CoQ10 v teh izbranih oljih. Kot je opisano v poglavju 3.3.7.1. Stabilnost CoQ10 v rastlinskih oljih smo spremljali stabilnost CoQ10 suspendiranega v oljih v klimatski komori pri 40°C. Ugotovili smo, da je CoQ10 precej bolj stabilen v oljih kot v brezvodnem etanolu, kajti njegov delež se skoraj ne spreminja po 3 tednih pri 40°C, medtem ko je v brezvodnem etanolu delež oQ10 hitro padal in po dveh tednih dosegel vrednost 0. Izmed uporabljenih olj je bil CoQ10 po 3 tednih najbolj stabilen v sojinem in sončničnem olju, delež oQ10 pa je bil nekoliko nižji v olivnem olju (83%). V sojinem olju z dodanim vitaminom E je delež oQ10 odstopal le za nekaj % od začetne vrednosti (Slika 45).

Iz primerjave spremljanja deleža oQ10 v olju in izdelku B je razvidno, da je upad v slednjem večji. Pri izdelku A, ki ne vsebuje AK, pa se delež minimalno spreminja s časom (Slika 46). Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da so za oksidativno nestabilnost oQ10 poleg AK odgovorne tudi druge komponente, ki jih ta izdelek vsebuje. Namreč tako izdelek B kot tudi olje vsebujeta kombinacijo CoQ10 in AK v enakem razmerju. Iz primerjave deležev oQ10 v sojinem olju in oQ10 v sojinem olju z dodanim vitaminom E smo predhodno ugotovili, da prisotnost vitamina E v sojinem olju ne vpliva na nestabilnost CoQ10 (Slika 45). Iz tega lahko sklepamo, da za bistveno nižjo vsebnost oQ10 v izdelku B ni odgovoren vitamin E. Predvidevamo, da bi lahko bili karotenoidi vzrok za oksidativno nestabilnost CoQ10, saj so prav tako prisotni v izdelku B. Zato bi bilo v prihodnje smiselno proučevati tudi te spojine v kombinaciji s CoQ10.

Stabilnost askorbinske kisline

Z namenom, da bi dobili dodatne informacije o vplivu AK na nestabilnost CoQ10 smo zaključku diplomskega dela spremljali stabilnost tudi AK, in sicer v treh različnih medijih (MiliQ voda, 50% EtOH, brezvodni EtOH), pri treh koncentracijah (enake kot v študiji stabilnost CoQ10) in pri dveh temperaturah 25 in 40°C. Uporabili smo drugo HPLC metodo kot je opisano v metodi 3.2.2, ki je selektivna, kar je razvidno iz kromatogramov brezvodnega etanola in vzorca askorbinske kisline s koncentracijo H (Sliki 47,48). Iz primerjave stabilnosti AK pri 25°C v brezvodnem etanolu pri vseh treh koncentracijah smo ugotovili, da je najbolj stabilna pri najvišji koncentracij (H), saj je po štirih dneh prisotno še 85% AK, medtem ko je vsebnost AK po dveh dneh pri koncentraciji M in L padla na 40% in 0. (Slika 49). Z namenom ugotovitve vpliva medija na stabilnost askorbinske kisline smo primerjali delež AK v MiliQ vodi, 50% EtOH in brezvodnem etanolu pri 25 in 40°C. Ker je AK v ostalih dveh medijih (voda, 50% etanol) pri srednji in nizki koncentraciji že po enem dnevu popolnoma oksidirala, smo primerjali stabilnost AK le pri najvišji koncentraciji (H). V vodi že po enem dnevu pade delež na 39%, po štirih dneh pa je delež glede na začetno vrednost AK enak 0. Bolj stabilna je AK v 50% EtOH, saj po enem dnevu pade delež na 69%, po štirih dneh je ostane še 12%. Najbolj stabilna pa je AK v brezvodnem etanolu, saj je po štirih dneh prisotno še 85% AK (Slika 50). Pri 40°C potekajo reakcije oksidacije z večjo hitrostjo, kar je razvidno tudi iz rezultatov. AK se v vodi in 50% EtOH popolnoma oksidira že po dveh dneh, medtem ko je v brezvodnem EtOH še vedno relativno stabilna (Slika 51). Za namene proučevanja nestabilnosti CoQ10 bi bilo smiselno v prihodnje testirati stabilnost askorbinske kisline tudi v rastlinskih oljih, saj je večina prehranskih dopolnil s CoQ10 v obliki oljnih kapsul.

6 SKLEP

- ❖ Z validacijo smo potrdili primernost analizne metode za vrednotenje CoQ10. Metoda je selektivna, linearna v območju 1-50 $\mu\text{g/ml}$, daje ponovljive in točne rezultate v celotnem delovnem območju koncentracij.
- ❖ Uporabljena HPLC metoda je primerna za testiranje nestabilnosti CoQ10 pri različnih T ob prisotnosti izbranih antioksidantov in reducentov v različnih medijih.
- ❖ Izbrana izdelka (A-Pharma Nord Super Bio-Qinon Q10[®] in B-Fidi Koencim10[®]) se razlikujeta, saj izdelek B vsebuje tudi askorbinsko kislino poleg CoQ10. Ugotovili smo, da delež oQ10 v izdelku B izrazito pada, medtem ko delež rQ10 v času 6 tednov pri 40°C in 75% relativne vlažnosti narašča. Delež oQ10 v izdelku A se praktično ni spreminjal v odvisnosti od časa. Sklepamo, da prisotna askorbinska kislina v izdelku B reducira CoQ10 in povzroči upad deleža oQ10.
- ❖ Standardne raztopine s CoQ10 so stabilne pri proučevanih T (25, 40, 50, 60°C) v brezvodnem etanolu kot tudi tista v 50% etanolu pri 40°C.
- ❖ Ugotovimo lahko, da na reakcijo redukcije CoQ10 z AK odločilno vpliva koncentracija prisotne AK. Pri najvišji koncentraciji AK se najbolj zniža delež oQ10 pri 60°C v raztopini z brezvodnim etanolom, hkrati je tudi konstanta reakcijske hitrosti 0. reda najvišja.
- ❖ Z dodatkom nekaterih izbranih antioksidantov (EA, KV, vitamin E) pri 40°C v enakih koncentracijah kot pri dodatku askorbinske kisline v raztopini z brezvodnim etanolom se delež oQ10 ne glede na koncentracijo dodanega antioksidanta ni spreminjal v odvisnosti od časa. Proučevani antioksidanti torej ne vplivajo na stabilnost CoQ10.
- ❖ Reducent DTT izrazito zmanjša delež oQ10 pri najvišji koncentraciji pri 40°C in posledično nastane največ rQ10. Medtem ko dvig T ne povzroči pospešitve reakcije vključno z nastankom rQ10.
- ❖ Reducent Na₂S še močneje reducira CoQ10, saj že ob času 0. pri najvišji koncentraciji pade delež oQ10 na 24%. Koncentracija dodanega Na₂S je odločilen dejavnik nestabilnosti. Z višanjem T tudi v tem primeru ni pospešitve redukcije oQ10.
- ❖ Ob dodatku HCOOH in Fe²⁺, ki delujeta kot reducenta, ni bilo zaznati sprememb v deležu oQ10.

- ❖ Na_2S je najmočnejši reducent v primerjavi z DTT in AK, kar se kaže tudi v hitrosti nastanka in obsegu rQ10. Najšibkejši je AK.
- ❖ CoQ10 je ob dodatku AK stabilen v izbranih rastlinskih oljih pri 40°C v času 3 tednov, in sicer najbolj v sojinem in sončničnem olju, prav tako v kombinaciji z vitaminom E glede na brezvodni etanol.
- ❖ Ugotovili smo, da je AK najbolj stabilna v brezvodnem etanolu, manj v 50% etanolu, najmanj pa v vodi pri najvišji koncentraciji in nižji temperaturi (25°C).
- ❖ Pri izdelku B, ki zraven oQ10 vsebuje še AK, gre za bistven porast rQ10. Smiselno bi bilo ugotoviti ali nekatere druge komponente izdelka dodatno pospešujejo reakcijo redukcije oQ10. Za vitamin E smo dokazali, da ne vpliva na nestabilnost oQ10.

7 LITERATURA

1. Pravilnik o prehranskih dopolnilih. Uradni list RS; št. 82/03, 44/04, 72/05, 22/07,104/2010.
2. Pravilnik o razvrstitvi zdravilnih rastlin. Uradni list RS; št. 133/2008.
3. Pravilnik o splošnem označevanju predpakiranih živil. Uradni list RS: št. 50/2004, 58/04, 43/05,64/05, 83/05,115/05, 118/07.
4. 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.
5. Inštitut za nutricionistiko: Zdravstvene trditve na živilih in prehranskih dopolnilih. Ljubljana, 1.12.2010. Zbornik predavanj.
6. Zakon o zdravilih (ZZdr-1); Ur.l. RS, št. 31/2006, 45/2008.
7. Mašič Peterlin L, Mravljak J: Resnice in polresnice o antioksidantih. Prehranska dopolnila, strokovno izobraževanje, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2010.
8. Žmitek J, Žmitek K: Koencim Q10 kot prehransko dopolnilo in zdravilo. Farmacevtski Vestnik 2009; 60: 150-7.
9. Crane LF: Biochemical Functions of Coenzyme Q10. Journal of the American College of Nutrition 2001; 6: 591-598.
10. Rus P, Rus RR: Koencim Q10. Zdravstveno Varstvo 2008; 47: 89-98.
11. Coenzyme Q10, ERNA Information Fact Sheets.
12. Pravst I, Žmitek K, Žmitek J: Coenzyme Q10 contents in food and fortication strategies. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2010; 50(4): 269-80.
13. Engelson J, Nielsen JD, Winther K: Effect of coenzyme Q10 and Ginko Biloba on Warfarin Dosage in stable, long-term warfarin treated outpatients. Arandomised, double blind, placebo-crossover trial. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2002; 87: 1075-6.
14. Bhagavan HN, Chopra RK: Coenzyme Q10: Absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. Free Radical Research 2006; 40: 445-453.

15. Beal MF, Henchcliffe C, Spindler M: Coenzyme Q 10 in neurodegenerative disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2009; 5: 597-610.
16. Papas AM: *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health*. CRC Press, USA, 1999: 232-236.
17. Dedoussis H, Kaliora AC, Schmidt H: Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 2006; 187: 1-17.
18. Littarru, GP, Tiano L: Clinical aspects of coenzyme Q10: An update. *Nutrition* 2010; 26: 250–254.
19. Bánhegyi G, Mandl J, Szarka A: Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *British Journal of Pharmacology* 2009; 157: 1097-1110.
20. <http://ipi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminC/>, dostopano marec 2012
21. Stevens JF, Traber MG: Vitamin C and E: Beneficial effect from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology & Medicine* 2011; 51: 1000-1013.
22. Abudua N, Attaelmannana M, Levinson SS, Millera JJ.: Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E. *Clinica Chimica Acta* 2004; 339: 11-25.
23. Papas AM: *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health*. CRC Press, USA,1999: 189-207.
24. Bandyopadhyay D, Chattopadhyay A: Vitamin E in the prevention of ischemic heartdisease. *Pharmacological reports* 2006; 58: 179-187.
25. <http://www.pomurske-lekarne.si/si/index.cfm?id=1768>, dostopano april 2012
26. Erlund I: Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research* 2004; 24: 851–874.
27. Kelly GS: Quercetin. *Alternative Medicine Review* 2011; 2: 172-194.
28. Landete JM: Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International* 2011;44:1150-1160.

29. Lazarini F, Brenčič J: Splošna in anorganska kemija, 3. natis, DZS, Ljubljana, 1992: 228-231.
30. Waterman KC, Adami RC, Alsante KM, Hong J, Landis MS, Lombardo F, Roberts CJ: Stabilization of Pharmaceuticals to Oxidative Degradation. *Pharmaceuticals Development and Technology* 2002;7(1):1-32.
31. Amidon GL, Connors KA, Stella VJ: Chemical stability of Pharmaceuticals. *A Handbook for Pharmacists*. John Wiley & Sons, New York, 1986:18-26, 82-105, 284-289.
32. Lund W: Principles and Practice of Pharmaceuticals. *The Pharmaceuticals Press*, London, 1994:277-310.
33. Ruocco V, Wolf D, Wolf R: Vitamin E: the radical protector. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 1998; 10: 103-117.
34. Sollner Dolenc M, Pečar S: Antioksidanti, Vaje iz farmacevtske kemije III, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 1997.
35. James AM, Murphy MP, Smith RA.J: Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2004; 423: 47–56.
36. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Topic Q2A (Text on Validation of Analytical Procedures), Topic Q2b (Validation of Analytical Procedures: Methodology).
37. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, maj 2001.
38. Razpotnik Simona: Določanje vsebnosti ubidekarenona v mehkih kapsulah z metodo HPLC. *Diplomska naloga*, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2011.
39. Terbuc Tanja: Proučevanje stabilnosti vodnih raztopin cisteina s tekočinsko kromatografijo z elektrokemično detekcijo. *Diplomska naloga*, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2003.

