

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATARINA PREMZL

**ŠTUDIJ NEZDRUŽLJIVOSTI UBIDEDEKARENONA IN
ASKORBINSKE KISLINE V MEHKIH ŽELATINASTIH KAPSULAH**

**STUDY ON INCOMPATIBILITY OF UBIDECARENON AND
ASCORBIC ACID IN SOFTGEL CAPSULES**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

Magistrsko delo sem opravljala na Zavodu za zdravstveno varstvo v Mariboru pod mentorstvom docenta dr. Jožka Cesarja.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju docentu dr. Jožku Cesarju za strokovne nasvete ter pomoč pri izdelavi magistrske naloge.

Prav tako se zahvaljujem Zavodu za zdravstveno varstvo v Mariboru, ki so mi omogočili uporabo prostorov, opreme in potrebnih materialov.

Posebna zahvala pa gre moji družini, ki so me ves čas študija podpirali in mi stali ob strani.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom docenta dr. Jožka Cesarja.

Katarina Premzl

Predsednica diplomske komisije:

izr. prof. dr. Marija Bogataj

Članica diplomske komisije:

doc. dr. Petra Kocbek

Ljubljana, december 2012

VSEBINA

POVZETEK	V
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1. UVOD.....	1
1.1. Radikali in njihov izvor	1
1.2. Oksidativni stres	2
1.3 Antioksidanti.....	3
1.3.1 Vitamin E.....	4
1.3.2 Vitamin C.....	5
1.3.3 Koencim Q ₁₀	6
1.4 Stabilnost zdravil	12
1.5 Validacija analiznih metod	13
2. NAMEN DELA	18
3. MATERIALI IN METODE	20
3.1 Materiali.....	20
3.1.1 Reagenti in topila.....	20
3.1.2 Aparature	20
3.1.3 Standardi.....	21
3.1.4 Vzorci	21
3.2 Metode	23
3.2.1 Umetno staranje vzorcev mehkih želatinastih kapsul.....	23
3.2.2 Priprava raztopin, vzorcev in mobilne faze za določanje vsebnosti askorbinske kisline.....	23
3.2.3 Priprava standardnih raztopin in raztopin vzorca za validacijo metode določanja vsebnosti askorbinske kisline	25
3.2.4 Kromatografski pogoji določanja vsebnosti askorbinske kisline	26
3.2.5 Določanje vsebnosti askorbinske kisline v mehkih želatinastih kapsulah.....	26
3.2.6 Priprava raztopin, vzorcev in mobilne faze za določanje vsebnosti ubidekarenona, ubikinola, α -tokoferola in α -tokoferil acetata	27
3.2.7 Kromatografski pogoji za metodo določanja vsebnosti ubidekarenona, ubikinola, α -tokoferola in α -tokoferil acetata	30

3.2.8	Določanje vsebnosti ubidekarena, ubikinola, α -tokoferola in α -tokoferil acetata v mehkih želatinastih kapsulah	30
4.	REZULTATI	33
4.1	Validacija analizne metode določanja vsebnosti askorbinske kisline v mehkih želatinastih kapsulah	33
4.1.1	Natančnost (ponovljivost HPLC sistema)	33
4.1.2	Točnost metode	33
4.1.3	Linearnost	35
4.2	Vsebnosti ubidekarena, ubikinola, α -tokoferola, α -tokoferil acetata in askorbinske kisline v vzorcih mehkih želatinastih kapsul	36
5.	RAZPRAVA	46
5.1	Razvoj analizne metode za določanje vsebnosti askorbinske kisline v mehkih želatinastih kapsulah	46
5.2	Modifikacije USP metode določanja vsebnosti ubidekarena v kapsulah	47
5.3	Določanje vsebnosti ubikinola, α -tokoferola in α -tokoferil acetata	48
5.3	Kromatogrami vzorcev	52
5.3.1	Vzorec 1	52
5.3.2	Vzorec 2	53
5.3.3	Vzorec 3	55
5.3.4	Vzorec 4	59
6.	SKLEP	63
7.	LITERATURA	65

POVZETEK

Koencim Q₁₀ (ubidekarenon) je lipofilna molekula, prisotna v vsaki živi celici, kjer deluje kot prenašalec elektronov v procesu tvorbe ATP v mitohondrijih ter kot antioksidant. Učinkovitost biosinteze koencima Q₁₀ s staranjem in pri uporabi nekaterih zdravil (statinov) pada, zato imamo na tržišču številna funkcionalna živila, prehranska dopolnila in zdravila s koencimom Q₁₀, s katerimi je mogoče povečati njegov naravni dnevni vnos v telo. Nekatera zdravila in prehranska dopolnila vsebujejo poleg koencima Q₁₀ še dodatne antioksidante (vitamin E, vitamin C, β-karoten, selen, itd.) z namenom doseganja sinergističnih učinkov oz. učinkovitejšega antioksidativnega delovanja zoper radikale.

Predhodne raziskave nam kažejo, da v primeru, ko sta v mehkih želatinastih kapsulah hkrati prisotna askorbinska kislina (vitamin C) in ubidekarenon (kinonska oblika Q₁₀), ta dva med seboj reagirata in sta zato nekompatibilna: askorbinska kislina nastopa kot reducent, ki se oksidira do dehidroaskorbinske kisline, ubikinon pa kot oksidant, ki se reducira v ubikinol. S stališča kakovosti zdravil je takšna kombinacija nesprejemljiva. S terapevtskega stališča pa je pretvorba ubidekarena v ubikinol celo ugodna, ker ima ubikinol višjo biološko uporabnost, v organizmu pa se obe obliki nahajata v ravnotežju.

V magistrski nalogi smo spremljali vsebnosti ubidekarena, ubikinola ter celokupnega koencima Q₁₀ v štirih vzorcih mehkih želatinastih kapsulah različne sestave in različnih proizvajalcev, ki so pri nas na voljo kot zdravila ali prehranska dopolnila. Vzorce smo za 6 tednov v klimatskih komorah izpostavili različnim temperaturam in vlagi (25 °C/RV 60 %, 30 °C/RV 65 % in 40 °C/RV 75 %) ter jim določili vsebnosti učinkovin na začetku, po 1, 2, 3, 4 in 6 tednih. Poleg vsebnosti koencima Q₁₀ smo v dveh vzorcih spremljali tudi vsebnost askorbinske kisline, v dveh vzorcih vsebnost α-tokoferil acetata in v enem vzorcu vsebnost α-tokoferola.

Metodo za določanje vsebnosti askorbinske kisline s HPLC in UV detekcijo smo razvili na podlagi literaturnih podatkov ter jo ustrezno validirali. Za vrednotenje vsebnosti celokupnega koencima Q₁₀ smo uporabili obstoječo HPLC metodo določanja ubidekarena v kapsulah po ameriški farmakopeji (USP) z manjšimi modifikacijami. Ker s to metodo ne moremo zaznati pretvorbe ubikinona v ubikinol, saj priprava vzorca vključuje uporabo železovega (III) klorida, ki kinol oksidira nazaj v kinon, smo pri pripravi vzorca za vrednotenje vsebnosti samega ubikinona, ubikinola, α-tokoferola in α-tokoferil acetata izključili dodatek železovega (III) klorida, ostala priprava pa je ostala enaka.

Rezultati nam potrjujejo, da je sam ubidekarenon v mehkih želatinastih kapsulah stabilen pri vseh preučevanih pogojih in se njegova vsebnost ne spreminja tekom časovnega obdobja stresnega testiranja. Vsebnosti α -tokoferola ali α -tokoferil acetata sta prav tako konstantni v preiskovanem časovnem obdobju, njuna prisotnost pa ne vpliva na stabilnost ubidekarena. Kadar pa je v kapsule dodana askorbinska kislina, le-ta zreagira z ubidekarenonom, zato njuna vsebnost s časom pada, vsebnost ubikinola pa narašča. Pri najostrejših pogojih shranjevanja (40 °C/RV 75 %) je tako v 6 tednih zreagirala praktično ves ubidekarenon. Celokupna vsebnost koencima Q₁₀, kot jo določimo z USP metodo, pa se ni bistveno spreminjala, zato ta metoda ni primerna za vrednotenje ubidekarena v kapsulah, ki vsebujejo kombinacije večih antioksidantov.

ABSTRACT

Coenzyme Q₁₀ (ubidecarenone) is a lipophilic molecule present in every living cell where it functions as an electron carrier in the mitochondrial ATP formation as well as an antioxidant. The biosynthesis of coenzyme Q₁₀ declines with aging and is impaired by using certain drugs (e.g. statins). Therefore, numerous functional foods, nutritional supplements and medicines with coenzyme Q₁₀ are available to increase its daily intake. In some of these products the coenzyme Q₁₀ is combined with other antioxidants (vitamin E, vitamin C, β -carotene, selen, etc.) to achieve synergistic antioxidant effect against radicals.

Previous results suggest that simultaneous presence of ascorbic acid (vitamin C) and ubidecarenone (oxidized quinone form of Q₁₀) in soft gelatin capsules leads to a reaction between both species. Ascorbic acid acts as a reducing agent that is oxidized to dehydroascorbic acid and ubiquinone is an oxidant that is reduced to ubiquinol. This combination is therefore not acceptable from the drug quality point of view. However, the reduction of ubidecarenone to ubiquinol might even be therapeutically beneficial since the quinol form has a higher bioavailability. In living organism both forms are present in equilibrium.

In this work the contents of ubidecarenone, ubiquinol and total coenzyme Q₁₀ were followed in four samples of soft gelatin capsules with different composition and from different manufacturers. Three products are commercially available as nutritional supplements and one as a medicine. Samples were stored under different conditions (25 °C/RH 60 %, 30 °C/RH 65 % and 40 °C/RH 75 %) in stability chambers and the contents of drug substances were determined at the beginning of the study and after 1, 2, 3, 4 and 6 weeks. In addition to coenzyme Q₁₀, contents of ascorbic acid and α -tocopheryl acetate were followed in two samples each and α -tocopherol content was followed in one sample.

A HPLC method with UV detection for the determination of ascorbic acid in soft gelatin capsules basing on previously published methods was developed and validated. USP method for the assay of ubidecarenone capsules was used for the determination of total coenzyme Q₁₀ with minor modifications. This method does not detect the conversion of ubiquinone to ubiquinol since it includes the addition of ferric (III) chloride during sample preparation that oxidizes quinol back to quinone. Therefore, this step was omitted for

samples in which ubidecarenone, ubiquinol, α -tocopherol and α -tocopheryl acetate were determined.

Our results confirm that ubidecarenone itself is stable in soft gelatin capsules under conditions studied and its content remains constant. Contents of α -tocopherol and α -tocopheryl acetate are constant as well and their presence does not affect the stability of ubidecarenone. When ascorbic acid is added, a reaction with ubidecarenone proceeds and the contents of both substances decline while the content of ubiquinol rises. Under the most stringent conditions studied practically all ubidecarenone has reacted after 6 weeks. On the other hand, the total amount of coenzyme Q₁₀ as determined by the USP method remained unaffected. Therefore, this method is not suitable for the determination of ubidecarenone in capsules that combine multiple antioxidants.

SEZNAM OKRAJŠAV

AO	antioksidant
ASK	askorbinska kislina
ATP	adenozin trifosfat
CAT	katalaza
CoQ ₁₀	koencim Q ₁₀
DHASK	dehidroaskorbinska kislina
FLD	flourescenčni detektor
HPLC	visokoločljivostna tekočinska kromatografija (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICH	mednarodna konferenca o usklajevanju (<i>International Conference on Harmonisation</i>)
GP _x	glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GSH	reducirana oblika glutaciona
MPA	<i>meta</i> -fosforjeva kislina
RNS	reaktivne dušikove zvrsti
RONs	reaktivne dušikove in kisikove zvrsti
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
RSD	relativna standardna deviacija
RV	relativna vlaga
SD	standardna deviacija
SOD	superoksid dismutaza
UV	ultravijolična svetloba
USP	farmakopeja Združenih držav Amerike (<i>United States Pharmacopeia</i>)

1. UVOD

Kisik je ključnega pomena za življenje, hkrati pa je zaradi dveh nesparjenih elektronov v zunanji orbitali relativno precej reaktivna molekula. Oksidativne lastnosti kisika igrajo pomembno vlogo v različnih bioloških procesih, ki se vršijo v telesu. Med sintezo molekule ATP (adenozin trifosfat), ki služi kot ključni rezervoar celične energije, se kisik porablja, pri tem pa na več stopnjah dihalne verige nastajajo tudi reaktivne kisikove (ROS) in dušikove spojine (RNS) (1, 2). V nizkih oziroma zmernih koncentracijah so reaktivne zvrsti koristne, saj sodelujejo pri celični redoks signalizaciji in podpirajo delovanje imunskega sistema. V višjih koncentracijah pa lahko povzročijo oksidativni stres, kateri poškoduje strukturo celic in uniči njihovo delovanje, kar pa ima za posledico kardiovaskularna, nevrološka in nekatera druga bolezenska stanja (1).

Učinkovita obramba zoper poškodbe, ki jih sprožijo radikali, so antioksidanti (1). Ti že v zelo nizkih koncentracijah upočasnijo ali preprečijo oksidacijo drugih snovi v celici največkrat tako, da preprečijo nastajanje radikalov (3).

Vpletenost antioksidantov v preprečevanje razvoja patoloških procesov in zaviranje procesov staranja povečuje pomen antioksidantov kot zdravilnih učinkovin ali prehranskih dopolnil. Z njihovo pravilno uporabo bi lahko razvoj mnogih bolezni preprečili ali upočasnili že na samem začetku (3).

1.1. Radikali in njihov izvor

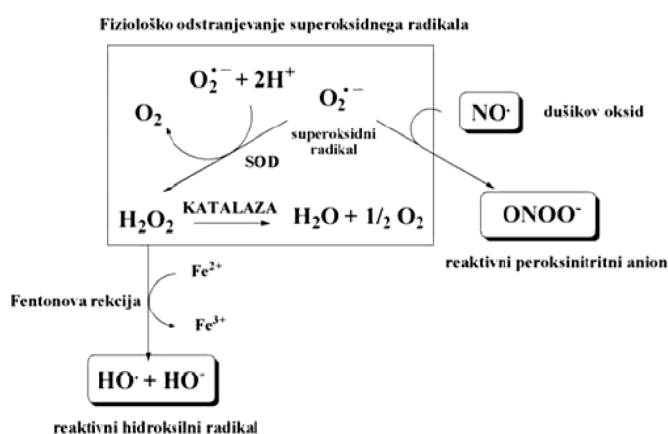
Radikali so definirani kot atomi, molekule, ioni ali kompleksi, ki imajo neparno število elektronov. Neparni elektroni dajejo radikalom visoko kemično reaktivnost in posledično nestabilnost. Zaradi omenjene lastnosti hitro reagirajo z drugimi molekulami in spojinami, saj skušajo ponovno vzpostaviti ravnovesje v svoji zgradbi. Tovrstne reakcije potekajo nenadzorovano, mimo encimskih sistemov in so škodljive za celico, saj jo poškodujejo, kot posledica pa nastopijo razna obolenja.

Radikali neprestano nastajajo v telesu iz endogenih in eksogenih spojin, pri čemer gre za normalni fiziološki proces. Deloma nastanejo v telesu kot neželeni produkti nepopolnega celičnega dihanja, nekaj jih tvorijo bele krvničke kot obrambni mehanizem proti bakterijam, lahko pa so tudi produkt psihičnega ali telesnega stresa. Veliko radikalov lahko nastane v organizmu zaradi vnosa različnih telesu tujih snovi, kot so pesticidi, umetna

barvila, konzervansi, zdravila, alkohol ter zaradi izpostavljenosti cigaretnemu dimu, UV sevanju, gama žarkom, mikrovalovom, onesnaženemu zraku, itd. (1, 4).

1.2. Oksidativni stres

Oksidativni stres je posledica porušanja ravnotežja med prooksidativnimi in antioksidativnimi procesi v celici. Prekomerna tvorba radikalov in ostalih ROS in RON ali nezadosten obrambni antioksidativni sistem, pomembno prispevajo k sproženju začetka nekaterih bolezenskih procesov (npr.: raka, kardiovaskularnih bolezni, nevroloških okvar, diabetesa, procesa staranja) (1, 5). Sam začetek procesa je največkrat posledica nekontrolirane in prekomerne tvorbe superoksidnega radikala ($O_2^{\bullet-}$). Na opisano situacijo je organizem v omejenem obsegu pripravljen, saj ima encime, sposobne pretvorbe superoksidnega radikala v manj nevarne kemijske zvrsti. Tako se superoksidni radikal v seriji dveh zaporednih reakcij, ki ju katalizirata superoksid dizmutaza (SOD) in katalaza, pretvori do vode in kisika (3). V primeru prekomernega nastajanja ROS pa se omenjena obramba zasiti, posledično začnejo nastajati drugi radikali in intermediati (npr.: hidroksilni radikal (HO^{\bullet}) in peroksinitritni anion ($ONOO^-$)) (slika 1) (3).



Slika 1: Razstrupljanje superoksidnega radikala in nastanek reaktivnih kisikovih in dušikovih spojin – RONS (3).

Oksidativne poškodbe celičnih makromolekul vodijo do porušanja ravnotežja v celici in povzročijo poškodbe vseh glavnih bioloških molekul: nukleinskih kislin, lipidov in proteinov. Te poškodbe so lahko reverzibilne ter odvisne od antioksidativnega sistema in stresnih proteinov. Če pa so poškodbe ireverzibilne, vodijo celico v celično smrt (5).

1.3 Antioksidanti

Antioksidant (AO) je vsaka snov, ki že v nizki koncentraciji zmanjša ali prepreči oksidacijo drugih snovi. Pri tem se v večini primerov sam oksidira (1). Za nevtralizacijo prostih radikalov v telesu skrbijo različni endogeni (se sintetizirajo v telesu) in eksogeni antioksidanti (jih vnašamo v telo), ki jih delimo na:

- **ENCIMSKE ANTIOKSIDANTE:** superoksidna dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GP_x) in glutation reduktaza (GR).
- **NE-ENCIMSKE ANTIOKSIDANTE:**
 - **Metabolične AO:** reducirana oblika glutationa (GSH), lipoična kislina, L-arginin, koencim Q₁₀, melatonin, sečna kislina, bilirubin, železo-vezujoč protein transferin, proteini, ki vežejo baker (ceruloplazmin in albumin), itd..
 - **AO, ki jih vnesemo v telo s hrano, prehranskimi dopolnili ali zdravili:** vitamin E, vitamin C, karotenoidi (npr. β-karoten), nekateri mikroelementi (selen, cink), flavonoidi, omega-3 in omega-6 maščobne kisline, itd. (1, 3).

Glede na njihovo topnost pa jih lahko delimo na **AO, topne v lipidih** (npr.: vitamin E, koencim Q₁₀, bilirubin) in **AO, topne v vodi** (npr.: vitamin C, sečna kislina) (6).

Poznamo tri mehanizme delovanja antioksidantov:

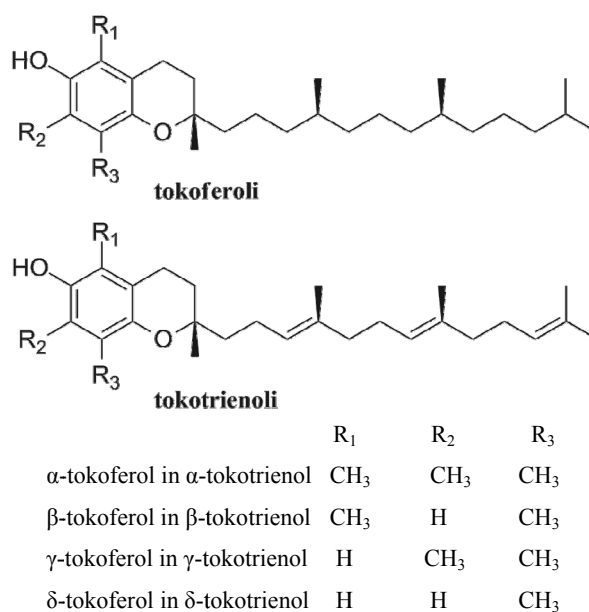
Preventivni AO (kelatorji) vežejo nase ione prehodnih kovin (najpomembnejši sta železo in baker) in s tem preprečijo njihove interakcije z vodikovim peroksidom in superoksidnim radikalom, ki vodijo do nastanka nevarnih hidroksilnih radikalov. V to skupino uvrščamo transferin, ceruloplazmin in albumin.

V drugi skupini so **encimski AO** (SOD, GP_x, GR ter CAT), ki se nahajajo v celicah. Ti encimi katalizirajo pretvorbo radikalov in RONS v manj reaktivne produkte.

V tretjo skupino uvrščamo **reducirajoče AO**. To so donorji elektronov, ki reagirajo z radikali, preden le ti reagirajo z drugimi molekulami. Tak AO se oksidira v relativno stabilen in nereaktiven radikal, ki se bodisi regenerira ali pa izloči iz organizma. V tej skupini je mnogo predstavnikov: vitamin C, vitamin E, koencim Q₁₀, različni β-karoteni, bilirubin, tiolne spojine, organske kisline, flavoni, polifenoli, itd. (3).

1.3.1 Vitamin E

Naravna oblika vitamina E vključuje osem strukturno sorodnih tokoferolov in tokotrienolov, ki jih delimo glede na položaj in število metilnih skupin na α , β , γ in δ oblike (slika 2) (7, 8). Osnovna struktura vseh oblik vitamina E se sestoji iz kromanskega obroča na katerega je pripeta hidroksilna skupina (iz nje se lahko odcepi H-atom za redukcijo radikalov) in hidrofobne stranske verige iz 15-ih C-atomov (ta omogoča dobro topnost v bioloških membranah). Tokotrienoli se strukturno razlikujejo od tokoferolov po tem, da imajo v stranski verigi ogljikovodika prisotne tri *trans* dvojne vezi (9,10).



Slika 2: Kemijske strukture tokoferolov in tokotrienolov.

Vitamin E je lipidotopen vitamin in naravni antioksidant. Topen v večini organskih topil, netopen pa v vodi. Nahaja se predvsem v rastlinskih oljih (npr. olju pšeničnih kalčkov, sončničnem olju, olivnem olju, itd.) ter v žitih in stročnicah (7, 8, 10).

α -tokoferol je oblika vitamina E, ki ima *in vivo* največjo biološko uporabnost v primerjavi z ostalimi sedmimi oblikami. Poleg njega se v telesu nahaja še γ -tokoferol, ki pa ima trikrat manjšo biološko aktivnost v primerjavi z α - obliko (11). V človeškem telesu za njegovo skladiščenje in znotrajcelično distribucijo skrbi jetrni α -tokoferol transportni protein (α -TTP), ki selektivno veže in prenaša α -tokoferol do vitalnih organov ter je odgovoren za vzdrževanje njegove koncentracije v plazmi in posameznih tkivih (12).

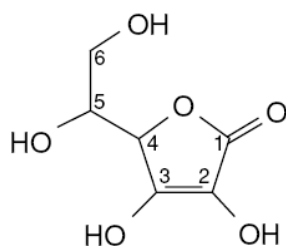
Glavna naloga α -tokoferola v telesu je, da ščiti polinenasičene maščobne kisline, lipoproteine in maščobne zaloge pred njihovo oksidacijo, tako da deluje kot lovilec

radikalov (10, 12). Pri tem po reakciji z radikalom nastane oksidiran α -tokoferil radikal, ki se s pomočjo drugih antioksidantov, kot so askorbinska kislina, retinol ali ubikinol, pretvori nazaj v reducirano obliko (2). Številni avtorji domnevajo, da ima α -tokoferol poleg antioksidativnega delovanja tudi druge biološke funkcije, ki so posledica njegovih specifičnih interakcij z različnimi encimi, receptorji, strukturnimi proteini, lipidi in transkripcijskimi faktorji (13, 14).

1.3.2 Vitamin C

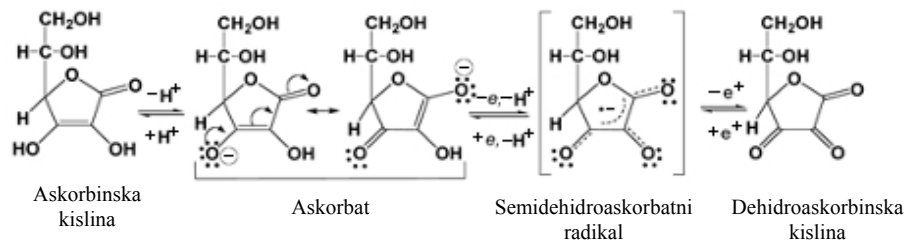
Vitamin C (L-askorbinska kislina (ASK)) je vodotopen vitamin. Nekatere živali in rastline so ga sposobne same sintetizirati iz glukoze s pomočjo encima L-gulonolakton oksidaze, ki katalizira zadnjo stopnjo v biosintezi askorbinske kisline. Ljudje imamo pomanjkanje tega encima, zato je potrebno vitamin C vnašati v telo s hrano. Iz črevesja se absorbira tako s pasivno difuzijo kot z aktivnim transportom (15, 16, 17). Najbogatejši viri vitamina C so sveže sadje in zelenjava. Največ ga vsebujejo plodovi citrusov, jagode, paprika, brokoli, špinača, zelje, paradižnik in krompir (17, 18). Priporočeni dnevni vnos znaša od 60 do 90 mg.

Molekula ASK vsebuje dva ogljikova kiralna atoma, C4 in C5, zaradi katerih so teoretično možni štirje stereoizomeri askorbinske kisline: L- in D-askorbinska kislina ter L- in D- izoaskorbinska kislina (slika 3). Kot vitamin (kofaktor v encimih) je v človeškem organizmu edina aktivna oblika L-askorbinska kislina (15).



Slika 3: Kemijska struktura askorbinske kisline.

V vodni raztopini je ASK (reducirana oblika vitamina C) močan reducent in se hitro ter reverzibilno pretvori v dehidroaskorbinsko kislino (DHASK), oksidirano obliko vitamina C. To reakcijo lahko katalizirajo različni oksidanti, kot so molekularni kisik, kovinski ioni, halogeni in encimi (slika 4). V večini se v fizioloških pogojih askorbinska kislina nahaja v ionizirani obliki kot askorbat (anion askorbinske kisline) (15, 17, 19).



Slika 4: Pretvorba askorbinske kisline do dehidroaskorbinske kisline (20).

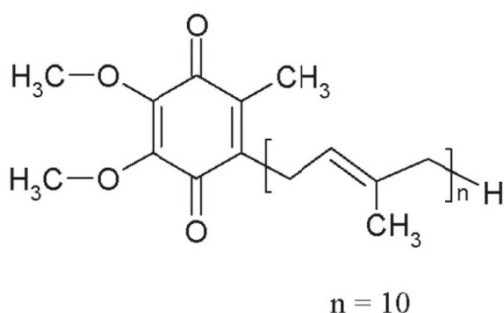
ASK ima v telesu številne funkcije, tako zaradi svojih kemijskih lastnosti kot zaradi vloge kofaktorja pri številnih encimskih reakcijah (npr. sodeluje pri sintezi kolagena). Je najpomembnejši zunajcelični antioksidant, prav tako pa ščiti pred oksidativnimi poškodbami tudi znotrajcelične komponente v citosolu in celični membrani. V zunajceličnem prostoru in citosolu lahko deluje kot primarni AO, tako da z oddajo elektrona reducira pri oksidaciji nastale radikale. Pri tem se sama pretvori v askorbatni radikal, ki pa je relativno nereaktiven in ne povzroča celičnih poškodb. V celični membrani pa deluje kot AO tako, da odda e^- in regenerira nastali α -tokoferil radikal nazaj v α -tokoferol (15, 19).

Ob prisotnosti kovinskih ionov (npr. bakrovih, železovih) in molekularnega kisika pa je lahko delovanje ASK tudi pro-oksidativno, pri čemer pride do tvorbe hidroksilnega radikala (OH^\bullet), ki je izjemno reaktiven in reagira z večino organskih molekul. Ker je večina kovinskih ionov v biološkem okolju kompleksiranih, ta reakcija v *in vivo* pogojih v glavnem ne poteka (15, 17).

1.3.3 Koencim Q₁₀

Koencimi Q (ubikinoni) so lipofilne molekule, ki so naravno prisotne v vsaki živi celici. Ime ubikinon je sestavljeno iz prepone ubi (povsod prisoten) in kinon-a, ki se nanaša na njegovo kemijsko strukturo (21, 22). Gre za 2,3-dimetoksi-5-metil-6-poliizoprenil-1,4-benzokinone, ki jih poimenujemo glede na dolžino poliizoprenske verige (stranske verige). Stranska veriga koencima Q₁₀ (CoQ₁₀) je tako sestavljena iz desetih izoprenskih enot (slika 5) in daje molekuli močan lipofilen značaj. CoQ₁₀ ne uvrščamo med vitamine, ker ga človeški organizem tudi sam sintetizira v vseh tkivih, vendar je njegov nivo variabilen. Največ ga nastane v organih z intenzivnim metabolizmom (srcu, jetrih, ledvicah, možganih in pljučih), pri čemer se ga od 40 do 50 % celotne količine nahaja v membranah

mitohondrijev, od 25 do 30 % v celičnem jedru, od 15 do 20 % v endoplazmatskem retikulumu in od 5 do 10 % v citosolu (23).



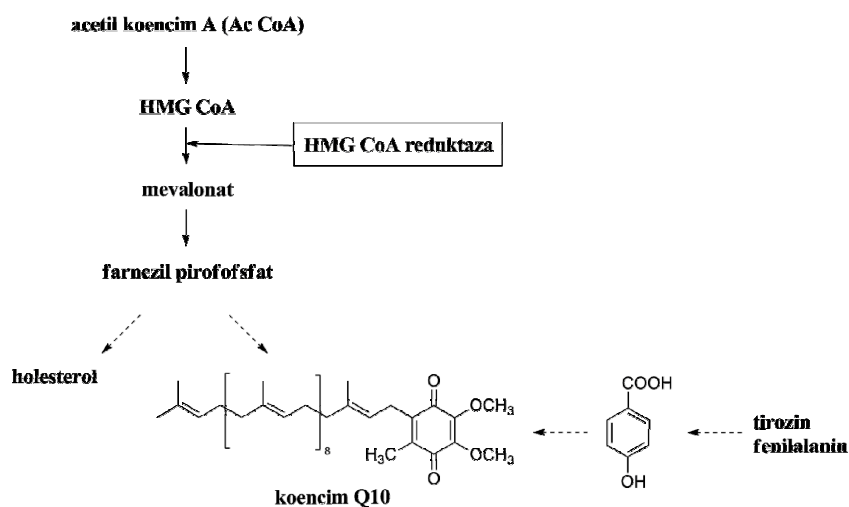
Slika 5: Kemijska struktura koencima Q₁₀ (ubidekarenona).

Biosinteza koencima Q₁₀

Njegova biosinteza poteka iz tirozina preko kaskade osmih aromatskih prekurzorjev, v proces pa je vključenih več vitaminov: C, B2, B12, folna kislina, niacin in pantotenska kislina (21). Pomembno vlogo pa ima tudi encim hidrosimetilglutaril (HMG-CoA) reduktaza, kateri je pomemben tudi pri sintezi holesterola.

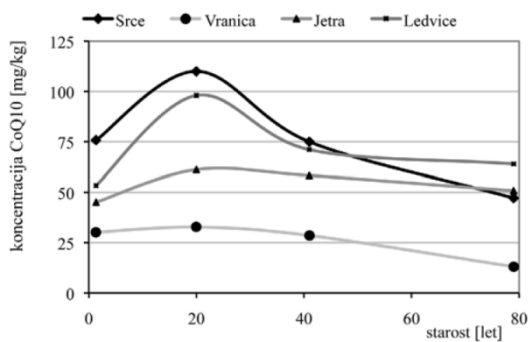
Proces biosinteze CoQ₁₀ zajema tri glavne stopnje, ki so prikazane na sliki 6:

- sinteza benzokinona iz aminokislina tirozina ali fenilalanina,
- sinteza izoprenske stranske verige iz acetil-koencima A (Ac CoA) preko mevalonatne poti,
- kondenzacija ali združevanje benzokinona z izoprensko stransko verigo (22).



Slika 6: Prikaz biosinteze koencima Q in holesterola.

Učinkovitost sinteze s staranjem telesa pada, še posebej velik padec koncentracije CoQ₁₀ pa so opazili v najaktivnejših organih (slika 7). Tako se npr. koncentracija v srcu začne nižati že po 20. letu starosti in se do 80. leta zniža za skoraj 60 %. Tudi v vranici se v enakem obdobju koncentracija zmanjša za 60 %, medtem ko je zmanjšanje v ledvicah in jetrih nekoliko manjše (35 oz. 17 %). Endogena sinteza CoQ₁₀ je lahko zmanjšana tudi pri bolnikih, ki se zdravijo z inhibitorji 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) reduktaze (statini), ki zavirajo nastajanje holesterola. Statini namreč kompetitivno inhibirajo tvorbo mevalonata, ki je prekursor tako pri biosintezi holesterola kot koencima Q₁₀. Pomanjkanje CoQ₁₀ so opazili tudi v različnih bolezenskih stanjih, pri ljudeh z neuravnoteženo prehrano in kadilcih (21).



Slika 7: Starostno povezane spremembe koncentracije CoQ₁₀ v nekaterih človeških organih (21).

Eksogeni vnos koencima Q₁₀ v telo

Z upadanjem učinkovitosti endogene sinteze CoQ₁₀ postaja pomembnejši eksogeni vnos (21). Z raziskavami so ocenili, da človek s hrano zaužije v povprečju le od 3 do 5 mg CoQ₁₀ na dan. Veliko CoQ₁₀ vsebuje meso, zlasti govedina, perutnina, drobovina in ribe (sardele), precej ga vsebuje tudi soja, rastlinska olja (olivno), arašidi in drugi oreški, zmerne količine pa se nahajajo v sadju, zelenjavi, jajcih in mlečnih izdelkih. Na splošno velja, da so živila, ki vsebujejo veliko maščobe, bogatejša s CoQ₁₀. Vsebnost CoQ₁₀ v izbranih živilih je prikazana v preglednici I (21, 22).

Preglednica I: Vsebnost CoQ₁₀ v nekaterih živilih (21).

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

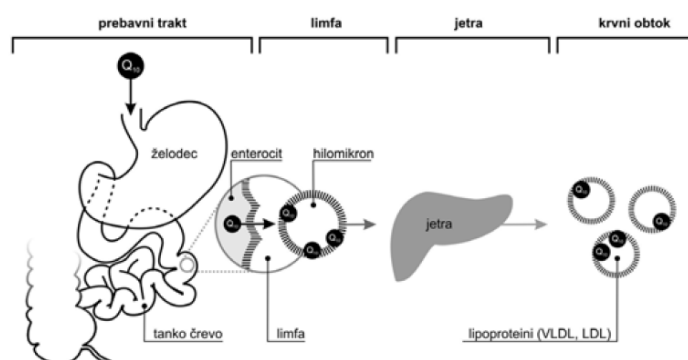
Z običajnim načinom prehranjevanja ni mogoče zadostiti povečanim potrebam po CoQ₁₀, še zlasti ne z nizkomaščobno hrano. Zato so se na tržišču pojavila funkcionalna živila, obogatena s tem koencimom, s katerimi je mogoče za nekajkrat povečati njegov povprečni naravni dnevni vnos v telo. V zadnjih letih so pravi razmah doživeli izdelki s CoQ₁₀ v različnih farmacevtskih oblikah, ki so na voljo bodisi kot zdravila, zlasti pa kot prehranska dopolnila. Z njimi lahko v telo vnašamo precej večje količine koencima Q₁₀, kot to lahko dosežemo s hrano (21).

Farmakokinetične lastnosti CoQ₁₀

Koencim Q₁₀ je zaradi svoje kemijske zgradbe praktično netopen v vodi, hkrati pa je omejena tudi njegova topnost v lipidih. Posledično se zelo slabo absorbira iz prebavnega trakta. Njegova biološka uporabnost je odvisna od več dejavnikov, tudi od načina zaužitja in odmerka CoQ₁₀. Absorpcijo lahko povečamo s hkratnim zaužitjem hrane in z delitvijo enega večjega na več manjših odmerkov CoQ₁₀ tekom dneva. Študije na glodalcih so pokazale le 2-3 % absorpcijo CoQ₁₀ iz črevesja v krvni obtok, pri ljudeh pa je nekoliko višja (predvidoma do 10 %). Učinkovitost absorpcije CoQ₁₀ je zelo odvisna tudi od farmacevtske oblike in uporabljene oblike učinkovine. Za povečanje absorpcije in s tem biološke uporabnosti so raziskovalci uporabili različne strategije v smeri optimizacije

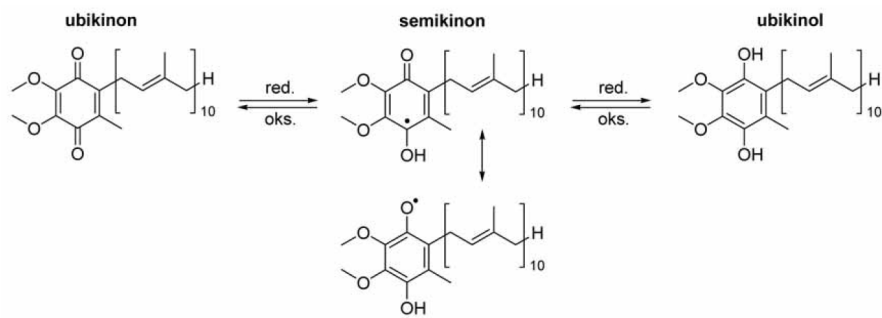
farmacevtske oblike in razvoja novih oblik CoQ₁₀. Prvi uspešni pristop je bila tvorba suspenzij v različnih oljih (mehke kapsule), kjer na povečanje absorpcije CoQ₁₀ (v primerjavi s trdimi kapsulami s kristaliničnim CoQ₁₀) iz teh izdelkov pomembno vplivajo mnogi dodatki, npr. emulgatorji. Naslednji koraki optimizacije farmacevtske oblike pa so šli v smeri izdelave različnih vodotopnih oblik (tvorba micel, inkluzijski kompleks CoQ₁₀ in β-ciklodekstrina) s katerimi je bilo doseženo znatno povečanje biološke uporabnosti CoQ₁₀ (21).

V raziskavi, kjer so primerjali biološko uporabnost kinonske (v obliki trdih kapsul) in kinolne (v obliki mehkih kapsul) oblike CoQ₁₀ pri ljudeh, so pokazali, da je absorpcija kinolne oblike bistveno boljša, saj se je celokupna najvišja plazemska koncentracija CoQ₁₀ zvišala za 4,3 krat, površina pod krivuljo (AUC₀₋₇₂) pa za 3,3 krat (24). Boljšo biološko uporabnost pa najbrž ne moremo pripisati samo kemijski strukturi CoQ₁₀, saj smo že prej omenili, da ima pomembno vlogo pri učinkovitosti absorpcije tudi farmacevtska oblika.



Slika 8: Shematski prikaz absorpcije in transporta CoQ₁₀ v telesu (21).

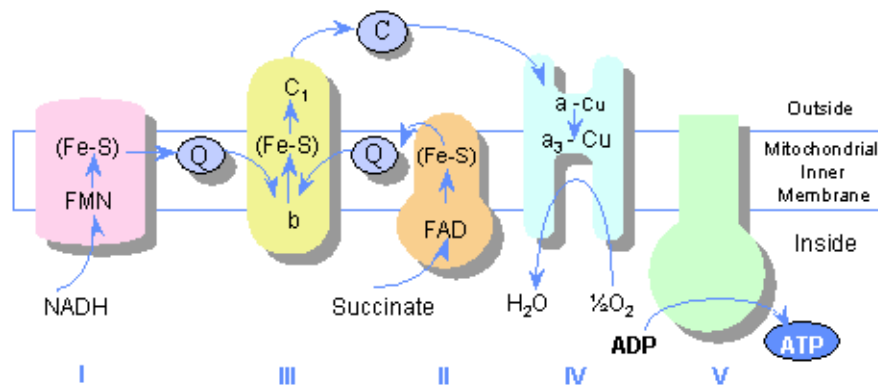
Mehanizem absorpcije in prenosa CoQ₁₀ (slika 8) je zelo podoben kot pri α-tokoferolu, ki je podobna lipofilna molekula. Za samo absorpcijo je potrebno predhodno emulgiranje s pomočjo žolčnih kislin v tankem črevesju. Med absorpcijo pride v enterocitih do redukcije kinona, ki se v krvi pojavlja predvsem v reducirani obliki. Vse biološke funkcije CoQ₁₀ temeljijo na njegovem redoks ravnotežju, saj relativno enostavno prehaja med ubikinonsko (oksidirano obliko), semikinonsko in ubikinolno obliko (reducirano obliko) (slika 9). Metabolizem CoQ₁₀ pri človeku ni dobro raziskan (večina raziskav je bila narejena na živalih), kot kaže pa se metabolizira v vseh tkivih, izloča pa se predvsem z blatom. Maksimalno plazemsko koncentracijo doseže v 2-6 urah po zaužitju, po prenehanju dodajanja pa se krvna koncentracija v nekaj dneh povrne na izhodiščno raven (21).



Slika 9: Redoks stanja koencima Q₁₀ (21).

Vloga CoQ₁₀ v dihalni verigi

Medtem ko je CoQ₁₀ koencim različnim membranskim encimom, je najbolj raziskana njegova ključna vloga prenosa elektronov v procesu celične dihalne verige, ki se vrši na notranji membrani mitohondrijev (21, 25). V tem procesu CoQ₁₀ prenaša elektrone iz kompleksa I ali kompleksa II na citokrom bc₁ v kompleksu III. Ko sprejme elektrone iz prvih dveh kompleksov preide v reducirano obliko ubikinol. Elektroni iz kompleksa III potujejo na citokrom c, od tukaj pa preko kompleksa IV do kisika, ki se reducira v vodo (slika 10) (25, 26).



Slika 10: Prenos elektronov v celični dihalni verigi (27).

Tok elektronov od reduciranih koencimov NADH ali FADH₂ preko naštetih kompleksov na kisik ustvarja tudi tok protonov skozi notranjo mitohondrijsko membrano. Nastali protonski gradient pa zagotavlja potrebno energijo za sintezo ATP (25).

Antioksidativno delovanje CoQ₁₀

Velik del ROS v celici nastane pri celičnem dihanju ($O_2^{\cdot-}$ in H_2O_2), prav tako prihaja v celicah do nastajanja ostalih radikalov, ki lahko poškodujejo celične lipide, proteine in DNK (28). Koencim Q₁₀ je edini lipidotopen AO, ki se sintetizira v človeškem telesu in ima v reducirani obliki (ubikinol) sposobnost antioksidativnega delovanja kot lovilec reaktivnih kisikovih spojin in radikalov (29, 30). Prav tako ubikinol reducira nastale α -tokoferil radikale, ki se tvorijo pri reakcijah z lipidnimi ali kisikovimi radikali, nazaj v α -tokoferol (26, 28, 29).

1.4 Stabilnost zdravil

Stabilnost je sposobnost farmacevtskega izdelka, da skozi čas roka uporabnosti ohranja svoje lastnosti znotraj potrjenih specifikacijskih mej pod pogojem, da se shranjuje pod predpisanimi pogoji in v predlagani ovojnini. Dejavniki, ki lahko vplivajo na stabilnost farmacevtskih izdelkov so: nestabilnost samih učinkovin, možne interakcije med učinkovinami oz. med učinkovinami in pomožnimi snovmi / razgradnimi produkti, pogoji med proizvodnimi procesi izdelave farmacevtske oblike, farmacevtska oblika, ovojnina in dejavniki okolja med prevozom, shranjevanjem in uporabo farmacevtskih izdelkov (temperatura, svetloba, zrak, vlaga, mikroorganizmi). Pri oceni stabilnosti farmacevtskega izdelka se proučuje kemijska, fizikalna, mikrobiološka, terapevtska in toksikološka stabilnost formulacije.

Fizikalna stabilnost se nanaša na organoleptične lastnosti (izgled, okus, vonj), na fizikalno stabilnost emulzij in suspenzij, hitrost sproščanja učinkovine iz farmacevtske oblike, velikost delcev, itd.

Kemijska stabilnost pomeni, da vsaka aktivna sestavina v farmacevtskem izdelku ohranja svojo kemijsko istovetnost in jakost znotraj določenih mej. Na splošno velja, da mora izdelek do izteka roka uporabnosti obdržati vsaj 90 % svoje jakosti. Razpad katerekoli snovi v farmacevtski obliki (zdravilne učinkovine ali pomožne snovi) lahko povzroči kemijsko in/ali fizikalno nestabilnost izdelka. Najpogostejše reakcije, ki potekajo znotraj farmacevtskih oblik so oksidacije, redukcije, hidrolize in fotolize.

Mikrobiološka stabilnost pomeni, da se ohranja sterilnost oziroma odpornost proti rasti mikroorganizmom v okviru določenih zahtev. Pri večodmernih farmacevtskih oblikah se

dodajajo za zaščito pred sekundarno mikrobiološko kontaminacijo protimikrobna sredstva (konzervansi).

Terapevtska stabilnost pomeni, da terapevtski učinek ostane nespremenjen skozi celoten čas roka uporabnosti farmacevtskega izdelka.

Toksikološka stabilnost mora zagotavljati, da se toksičnost izdelka do izteka roka znatno ne poveča (30, 31).

Stabilnost farmacevtskih izdelkov in zdravilnih učinkovin se spremlja s stabilnostnimi testi, ki so predpisani z ICH smernico Q1A(R2). Namen testiranja stabilnosti je, da se ugotovi, kako se kakovost zdravilne učinkovine oziroma farmacevtske oblike spreminja s časom pod vplivom različnih okoljskih dejavnikov, kot so temperatura, vlaga in svetloba. Na podlagi rezultatov stabilnostnih testov pa se določijo obdobja ponovnega testiranja zdravilne učinkovine, rok uporabnosti farmacevtskega izdelka in priporočljivi pogoji shranjevanja zdravila (32).

1.5 Validacija analiznih metod

Validacija je dokumentiran postopek, s katerim ovrednotimo karakteristike analitske metode in z njim dokažemo, da nam metoda daje pravilne, zanesljive in natančne rezultate (33, 34). Karakteristike analitske metode, ki so predpisane z ICH smernico Q2(R1) in jih vrednotimo tekom validacijskega protokola, so: točnost, natančnost, specifičnost oz. selektivnost, linearnost, delovno območje, meja zaznavanja, meja določanja in robustnost (35).

Točnost

Točnost nam pove, koliko rezultat, dobljen z analizno metodo, odstopa od prave (resnične) vrednosti. Točnost vsebnosti učinkovine v zdravilu lahko vrednotimo na več načinov:

- z dodatkom znanih količin učinkovine k zmesi vseh ostalih komponent vzorca (placebu)
- primerjava rezultatov metode z rezultati validirane metode z definirano točnostjo
- v primeru, da so dokazane natančnost, linearnost in specifičnost, lahko točnost predpostavimo.

Za določanje točnosti izvedemo vsaj devet meritev pri vsaj treh različnih koncentracijah, ki pokrivajo celotno območje metode (3 koncentracije/3 ponovitve vsake koncentracije).

Običajno jo izražamo kot izkoristek med vrednostjo, določeno z analitsko metodo, in pravo vrednostjo (enačba 1) ali pa kot % odstopanja od dodane vrednosti (enačba 2) (35).

Enačba 1:

$$\text{Izkoristek} = \frac{\text{določena vrednost}}{\text{prava vrednost}} \cdot 100 \%$$

Enačba 2:

$$\text{Odstopanje} = \frac{x_i - \mu_i}{\mu_i} \cdot 100 \%$$

x_i določena vrednost

μ_i dodana vrednost

Natančnost

Natančnost analizne metode izraža stopnjo ujemanja (stopnjo razpršenosti) rezultatov med serijo analiz istega homogenega vzorca pod predpisanimi pogoji. Običajno jo izražamo kot standardno deviacijo (SD) ali relativno standardno deviacijo (RSD). Čim manjša je standardna deviacija, bolj natančna je metoda. Natančnost analitske metode po ICH smernicah določimo tako, da izvedemo po tri ponovitve pri treh koncentracijah, ki pokrivajo območje metode, ali šest ponovitev pri 100 % tarčni koncentraciji.

Ovrednotimo jo lahko na treh različnih nivojih in sicer kot:

- **ponovljivost**: natančnost dobljena iz rezultatov meritev v kratkem času pri ponovljivih pogojih, kot so isti reagenti, isti analitik, isti dan, isti laboratorij itd.
- **rigidnost**: natančnost dobljena iz rezultatov meritev pri obnovljivih pogojih, kot so različni analitiki, različni dnevi, različne koncentracije, druga oprema itd.
- **reproducibilnost**: natančnost dobljena iz rezultatov meritev različnih laboratorijev (farmakopejski postopki, kolaborativne študije itd. (35).

Enačba 3:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

SD standardna deviacija

x_i vrednosti posameznih meritev

\bar{x} povprečna vrednost vseh meritev

n število meritev

Enačba 4:

$$RSD (\%) = \frac{SD \times 100}{\bar{x}}$$

RSD relativna standardna deviacija (%)

\bar{x} povprečna vrednost vseh meritev

SD standardna deviacija

Linearnost

Linearnost analize metode je lastnost, ki nam pove, ali so izmerjeni signali v določenem koncentracijskem območju sorazmerni koncentraciji analizirane snovi v vzorcih. Sorazmernost je lahko direktna ali po definirani matematični transformaciji. Izrazimo jo z enačbo premice ter korelacijskim koeficientom (35).

Enačba 5:

$y = k \cdot x + b$, enačba premice

Enačba 6:

$$k = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

k naklon regresijske premice

Enačba 7:

$$b = \bar{y} - k \cdot \bar{x}$$

b odsek na ordinatni osi

Enačba 8:

$$r = \frac{\left[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y}) \right]}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

r korelacijski faktor

\bar{x} aritmetična sredina meritev

x_i posamezna meritev

\bar{y} povprečna vrednost signala instrumenta

y_i posamezna vrednost signala instrumenta

Določamo jo skozi celotno območje analiznega postopka v najmanj petih različnih koncentracijah. Cilj je dobiti model, ki čim boljše opisuje razmerje med koncentracijo in odzivom (35).

Območje

Območje analizne metode je interval med najvišjo in najnižjo koncentracijo (količino) merjene snovi v vzorcu, za katerega so bile dokazane točnost, linearnost in natančnost. Običajno ga določimo iz območja linearnosti in je odvisno od namena metode. Izražamo ga v enakih enotah kot rezultate analizne metode (35).

Specifičnost/selektivnost

Selektivnost je sposobnost, da nedvoumno analiziramo preiskovane snovi v vzorcu ob prisotnosti drugih komponent, za katere lahko domnevamo, da so prisotne v vzorcu (nečistote, razpadni produkti, pomožne snovi itd.). Ugotavljamo jo tako, da analiziramo različne vzorce in opazujemo merjeno lastnost snovi, ki jo določujemo. Metoda je

selektivna, če na določeno lastnost ene komponente v zmesi ne vpliva nobena druga komponenta v zmesi (35).

Meja zaznavanja

Meja zaznavanja je najnižja koncentracija merjene snovi v vzorcu, ki jo z določeno analizo metodo še zaznamo, ni pa nujno, da jo lahko tudi kvantitativno določimo (35).

Meja določanja

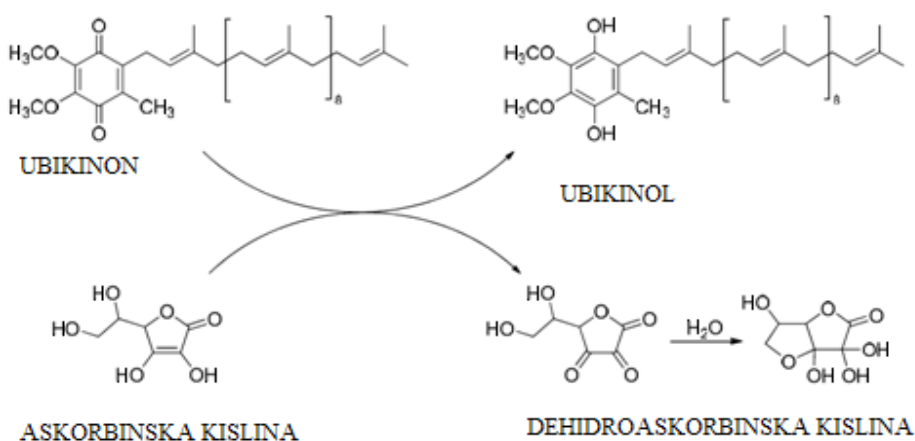
Meja določanja je najnižja koncentracija merjene snovi v vzorcu, ki jo z določeno analizo metodo določimo z ustrežno natančnostjo in točnostjo (35).

Robustnost

Robustnost analiznega postopka je njegova sposobnost, da ostane neprizadet zaradi majhnih vendar namernih razlik v parametrih metode. Predstavlja merilo za zanesljivost med normalno uporabo. Običajno jo določimo med razvojem analizne metode. Izražamo jo s primerjavo relativne standardne deviacije ali izkoristka pri spremenjenih pogojih s tistimi pri običajnih pogojih (35).

2. NAMEN DELA

Proizvajalci v prehranskih dopolnilih in zdravilih pogosto kombinirajo različne antioksidante z namenom doseganja sinergističnih učinkov. Predhodni rezultati nam kažejo, da v primeru, ko sta v mehkih želatinastih kapsulah hkrati prisotna askorbinska kislina (vitamin C) in ubidekarenon (kinonska oblika Q₁₀), med seboj reagirata in sta zato nekompatibilna (36). V okviru magistrskega dela želimo dokazati, da askorbinska kislina nastopa kot reducent, ki se oksidira do dehidroaskorbinske kisline, ubikinon pa kot oksidant, ki se reducira v ubikinol (slika 11).



Slika 11: Medsebojna reakcija med ubidekarenonom in askorbinsko kislino: slednja reducira ubikinon v ubikinol, sama pa se pretvori v dehidroaskorbinsko kislino.

Kinetiko medsebojne reakcije bomo spremljali z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (HPLC) v vzorcih z različno sestavo pod pogoji umetnega staranja v klimatskih komorah pri različnih pogojih. Uporabili bomo pogoje stabilnostnih testov, kot jih predpisuje ICH smernica Q1A(R2): 25 °C/RV 60 %, 30 °C/RV 65% in 40 °C/RV 75 % (32). Vzorcem bomo določali vsebnost učinkovin na začetku in po 1, 2, 3, 4 ter 6 tednih.

Za določanje vsebnosti ubidekarenona in ubikinola bomo uporabili postopek iz monografije 'Ubidecarenone Capsules' ameriške farmakopeje (37), pri čemer bomo vzorce pripravili tako z dodatkom kot brez dodatka FeCl₃. Slednji je namreč oksidant, ki morebitno reducirano obliko oksidira nazaj do kinona, tako da ob njegovem dodatku določimo celokupen koencim Q₁₀.

Za vzorce bomo uporabili mehke želatinaste kapsule s koencimom Q₁₀ različnih proizvajalcev in različne sestave, ki so na voljo na slovenskem trgu, bodisi kot prehranska dopolnila, bodisi kot zdravila.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Reagenti in topila

- Deionizirana voda pridobljena z aparatom Milli Q Integral 10 (Millipore; Bedford, ZDA)
- n-heksan, ultra resi, J.T.Baker (Nizozemska)
- brezvodni etanol (C_2H_5OH) $\geq 99,8$ %, p.a.; Sigma-Aldrich (Nemčija)
- acetonitril za HPLC (CH_3CN); J.T.Baker (Nizozemska)
- tetrahidrofuran za HPLC; J.T.Baker (Nizozemska)
- metanol za HPLC (CH_3OH); J.T.Baker (Nizozemska)
- železov klorid ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) p.a.; Fluka (Nemčija)
- *meta*-fosforjeva kislina ($(HPO_3)_n$, 40-44 %, $(NaPO_3)_n$, 56-60 %); Riedel-de Haën (Nemčija)
- oksalna kislina ($C_2H_2O_4 \cdot H_2O$) min.99,5 %, p.a.; Merck (Nemčija)
- kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), p.a.; Merck (Nemčija)
- *orto*-fosforjeva (V) kislina (H_3PO_4) 85 %, extrapure; Merck (Nemčija)

3.1.2 Aparature

- mikro tehtnica XP56/M (Metler Toledo International inc., Greifensee, Švica)
- analitska tehtnica AX205DR/M (Metler Toledo International inc., Greifensee, Švica)
- stresalnik GFL 3006 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Nemčija)
- ultrazvočna kopel Sonis 20 GT (Iskra Pio d.o.o., Šentjernej, Slovenija)
- centrifuga Centric 400R (Tehtnica Železniki, Železniki, Slovenija)
- pH meter inoLab (Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim, Nemčija)
- klimatska komora Kambič, tip: KK-1000 (Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija)
- klimatska komora Vötsch, tip: VC 0057 (Vötsch Industrietechnik, Reiskirchen-Lindenstruth, Nemčija)
- aparatura za HPLC: Agilent 1100 sistem z binarno črpalko, avtomatskim vzorčevalnikom, termostatom za kolono in DAD (*Diode Array Detector*) detektorjem (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA)

- aparatura za HPLC: 1260 Infinity sistem z binarno črpalko, avtomatskim vzorčevalnikom, termostatom za kolono, MWD (*Multi Wavelength Detector*) detektorjem (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA)
- NMR spektrometer Bruker AVANCE DPX400 (Bruker, Nemčija)

3.1.3 Standardi

- **Ubidekarenon (oksidirana oblika koencima Q₁₀):** oznaka: RICLF-FI, vsebnost: 98,0 %; TCI (Japonska)
- **Ubikinol (reducirana oblika koencima Q₁₀):** reducirano obliko Q₁₀ smo sami sintetizirali iz oksidirane oblike Q₁₀ z uporabo askorbinske kisline kot reducenta (poglavje 3.2.6)
- **Koencim Q₉:** referenčni standard; USP (ZDA)
- **D,L- α -tokoferol (vitamin E):** oznaka: KSSZD-DA, vsebnost: 97,3 %; TCI (Japonska)
- **α -tokoferil acetat (vitamin E acetat):** oznaka: 6DY2D, vsebnost: 97,8 %; TCI (Japonska)
- **Askorbinska kislina (vitamin C):** oznaka: BCBD5929V, vsebnost: 99,0 %; Sigma-Aldrich (Nemčija)

3.1.4 Vzorci

- **Vzorec 1:**

Koencim Q₁₀ mehke želatinaste kapsule (WALMARK, Češka (slika 12)):

- št. serije: D1B1484,
- uporabno do: 02/2014,
- deklarirana vsebnost učinkovine v eni kapsuli: koencim Q₁₀ = 30,0 mg
- pomožne snovi: sojino olje, želatina, glicerol, lecitin, železov oksid.



Slika 12: Kapsule Koencim Q₁₀ proizvajalca WALMARK.

- **Vzorec 2:**

CoQ10 mehke želatinaste kapsule (NOW FOODS, ZDA (slika 13)):

- št. serije: 1246987 1711,

- uporabno do: 05/2015,

- deklarirane vsebnosti učinkovin v eni kapsuli: koencim Q₁₀ = 50 mg

d-alfa tokoferil acetat = 20 mg

selen = 70 µg

- pomožne snovi: olje riževih otrobov, želatina, glicerol, voda, rožiči, čebelji vosek, lecitin iz soje.



Slika 13: Kapsule CoQ10 proizvajalca NOW FOODS.

- **Vzorec 3:**

KOENCIM Q10_{30mg} z antioksidanti mehke želatinaste kapsule (LEKARNA LJUBLJANA, Slovenija (slika 14)):

- št. serije: 010411,

- uporabno do: 04/2014,

- deklarirane vsebnosti učinkovin v eni kapsuli: koencim Q₁₀ = 30 mg

vitamin C = 33 mg

vitamin E (α-tokoferol) = 16,1 mg

selen = 14,6 µg

- pomožne snovi: sončnično olje, želatina, glicerol monostearat, sojin lecitin, titanov dioksid, rumeni, črni, rdeči železov oksid, natrijev selenit.



Slika 14: Kapsule KOENCIM Q10_{30mg} z antioksidanti proizvajalca LEKARNA LJUBLJANA.

- **Vzorec 4:**

Fidi koencim10[®] mehke želatinaste kapsule (FIDIMED, Slovenija (slika 15)):

- št. serije: 1445780001,

- uporabno do: 04/2013,

- deklarirane vsebnosti učinkovin v eni kapsuli:

koencim Q₁₀ = 30 mg

vseracemni- α - tokoferilacetat = 24 mg

vitamin C = 40 mg

selen = 15 μ g

betakaroten = 12 mg

- pomožne snovi: rafinirano, hidrogenirano in delno hidrogenirano sojino olje, suhi kvas, maščoba iz surovega masla, koruzno olje, rumeni vosek, lecitin, želatina, glicerol (85 %), železov oksid, titanov oksid.



Slika 15: Kapsule Fidi koencim10[®] mehke kapsule proizvajalca FIDIMED.

3.2 Metode

3.2.1 Umetno staranje vzorcev mehkih želatinastih kapsul

Kapsule smo 6 tednov umetno starali v klimatski komori pod pogoji, ki jih predpisuje ICH smernica Q1A(R2): 25 °C/RV 60 %, 30 °C/RV 65% in 40 °C/RV 75 % v originalni primarni ovojnini (pritisni omot ali plastični vsebnik).

3.2.2 Priprava raztopin, vzorcev in mobilne faze za določanje vsebnosti askorbinske kisline

Priprava topila (1 % m/v meta-fosforjeve kisline in 0,5 % m/v oksalne kisline, pH~1,7)

Natehtali smo 5,0 g MPA (*meta*-fosforjeva kislina) in 2,5 g oksalne kisline in ju prenesli v 500,0 mL bučko, dodali $\frac{3}{4}$ volumna prečiščene vode in raztapljanje pospešili s pomočjo ultrazvoka. Raztopino smo ohladili na sobno temperaturo in dopolnili bučko s prečiščeno

vodo do oznake volumna ter dobro premešali. Raztopino smo degazirali 10 minut v ultrazvočni kadički in shranjevali v hladilniku.

Priprava fosfatnega pufra (50 mM KH₂PO₄, pH = 3,0)

Natehtali smo 6,8 g KH₂PO₄ in ga prenesli v 1000,0 mL bučko, dodali 950 mL vode in uravnali pH na 3,0 z dodatkom fosforjeve (V) kisline. To raztopino smo prelili v 1000,0 mL bučko in dopolnili z vodo do oznake volumna.

Priprava mobilne faze

V 1000,0 mL bučko smo odmerili 20,0 mL metanola in dopolnili s fosfatnim pufrom (pH = 3,0) do oznake volumna.

Priprava standardne raztopine askorbinske kisline; RS_{ASK}

V 20,0 mL bučko smo natančno natehtali približno 16 mg standarda askorbinske kisline, dodali $\frac{3}{4}$ volumna topila in raztapljanje pospešili s pomočjo ultrazvoka. Raztopino smo ohladili na sobno temperaturo in dopolnili bučko s topilom do oznake volumna ter dobro premešali (**RS_{1ASK}**). V 20,0 mL bučko smo odpipetirali 2,0 mL raztopine RS_{1ASK} in dopolnili bučko s topilom do oznake volumna (**RS_{ASK}**). Koncentracija askorbinske kisline v standardu RS_{ASK} je bila približno 0,08 mg/mL.

Priprava raztopine vzorca; RV_{ASK}

Za pripravo raztopin **vzorcev 3** in **4** smo uporabili po dve kapsuli, kar pri **vzorcu 3** ustreza približno 66 mg, pri **vzorcu 4** pa približno 80 mg askorbinske kisline. Kapsuli smo prerezali z ostrimi škarjami in ju dali v 100 mL erlenmajerico z obrusom. Dodali smo 40 mL heksana in 40 mL topila, erlenmajerico zaprli in na stresalniku stresali 15 minut. Vsebinsko erlenmajerice smo prelili v 250 mL lij-ločnik. Erlenmajerico smo sprali z 10 mL topila in nato še z 10 mL heksana, kar smo prav tako prelili v lij-ločnik. Ko sta se organska in vodna faza ločili, smo vodno fazo odlili v 100,0 mL merilno bučko, k organski fazi pa smo dodali 40 mL svežega topila in stresali 3 minute. Po ločitvi faz smo vodno fazo prilili k prejšnji v 100,0 mL bučki in dopolnili bučko s topilom do oznake volumna. Del te raztopine smo centrifugirali 10 min na 3500 obratih/minuto. V 20,0 mL bučko smo odpipetirali 2,0 mL bistrega supernatanta in dopolnili bučko s topilom do oznake volumna (**RV_{ASK}**).

3.2.3 Priprava standardnih raztopin in raztopin vzorca za validacijo metode določanja vsebnosti askorbinske kisline

Priprava standardnih raztopin askorbinske kisline za vrednotenje linearnosti;

RS_{ASK,line.}

Natančno smo natehtali približno 100 mg standarda askorbinske kisline in ga prenesli v 100 mL bučko, dodali $\frac{3}{4}$ volumna topila in raztapljanje pospešili s pomočjo ultrazvoka. Raztopino smo ohladili na sobno temperaturo in dopolnili s topilom do oznake volumna ter dobro premešali (**RS1_{ASK,line.}**). Koncentracija askorbinske kisline v standardu RS1_{ASK,line.} je bila 1,00 mg/mL. Iz raztopine RS1_{ASK,line.} smo nato z naslednjimi redčitvami pripravili raztopine od 50 do 150 % delovne koncentracije (glede na vsebnost ASK v vzorcih) za dokazovanje linearnosti metode.

Redčenje:

1. 2,0 mL RS1_{ASK,line.} / 50,0 mL; c = 0,04 mg/ml (50 %)
2. 3,0 mL RS1_{ASK,line.} / 50,0 mL; c = 0,06 mg/ml (75 %)
3. 4,0 mL RS1_{ASK,line.} / 50,0 mL; c = 0,08 mg/ml (100 %)
4. 5,0 mL RS1_{ASK,line.} / 50,0 mL; c = 0,10 mg/ml (125 %)
5. 6,0 mL RS1_{ASK,line.} / 50,0 mL; c = 0,12 mg/ml (150 %)

Priprava raztopine vzorca za točnost metode; RV_{točnost}

Dve kapsuli **vzorca 1** smo prerezali z ostrimi škarjami, ju dali v 100 mL erlenmajerico z obrusom in jima dodali ustrezno količino standarda askorbinske kisline (cca. 40, 80 ali 120 mg). Dodali smo 40 mL heksana in 40 mL topila, zaprli erlenmajerico in na stresalniku stresali 15 minut. Vsebino erlenmajerice smo prelili v 250 mL lij-ločnik. Erlenmajerico smo sprali z 10 mL topila in nato še z 10 mL heksana, kar smo prav tako prelili v lij-ločnik. Ko sta se organska in vodna faza ločili, smo vodno fazo odlili v 100,0 mL merilno bučko, k organski fazi pa smo dodali 40 mL svežega topila in stresali 3 minute. Po ločitvi faz smo vodno fazo prilili k prejšnji v 100,0 mL bučki in dopolnili bučko s topilom do oznake volumna. Del te raztopine smo centrifugirali 10 min na 3500 obratih/minuto. V 20,0 mL bučko smo odpipetirali 2,0 mL bistrega supernatanta in dopolnili bučko s topilom do oznake volumna (**RV_{točnost}**).

3.2.4 Kromatografski pogoji določanja vsebnosti askorbinske kisline

Kolona: Luna C18(2) 100A, 250 × 4.6 mm, 5 μm delci (Phenomenex, Avstralija)

Pretok: 0,8 mL/min

Valovna dolžina: 245 nm

Volumen injiciranja: 10 μL

Temperatura kolone: 25 °C

Mobilna faza: 2 % metanol v fosfatnem pufru (pH = 3,0) → mobilno fazo smo filtrirali skozi 0,45 μm membranski filter in degazirali z uporabo ultrazvoka

Pogoji za ustreznost kromatografskega sistema:

- ločljivost med vrhoma oksalne kisline in ASK: $R > 3$
- faktor simetrije (*tailing*) za vrh ASK: 0,5 – 2,0
- ponovljivost med zaporednimi injiciranjem standardov: $RSD_3 < 2,0 \%$
- število teoretskih podov vrha ASK: $N > 3000$

3.2.5 Določanje vsebnosti askorbinske kisline v mehkih želatinastih kapsulah

Vsebnost askorbinske kisline v vzorcih smo izračunali s pomočjo enačbe 13:

Enačba 13:

$$m \text{ (askorbinske kisline) / kapsulo} = \frac{A_{vz.ASK} \cdot c_{st.ASK} \cdot F \cdot V_{vz}}{A_{st.ASK} \cdot N}$$

$A_{vz.ASK}$ površina kromatografskega vrha askorbinske kisline v raztopini vzorca

$A_{st.ASK}$ površina kromatografskega vrha askorbinske kisline v raztopini standarda

$c_{st.ASK}$ koncentracija askorbinske kisline v raztopini standarda v mg/mL

N število kapsul

F faktor redčenja (2 mL / 100 mL)

V_{vz} volumen raztopine vzorca v mL

3.2.6 Priprava raztopin, vzorcev in mobilne faze za določanje vsebnosti ubidekarenona, ubikinola, α -tokoferola in α -tokoferil acetata

Priprava 0,1 % (m/v) raztopine FeCl₃

Natančno smo natehtali 100 mg FeCl₃·6H₂O, ga prenesli v 100,0 mL bučko, dodali $\frac{3}{4}$ volumna brezvodnega etanola in raztapljanje pospešili s pomočjo ultrazvoka. Raztopino smo ohladili na sobno temperaturo in dopolnili z brezvodnim etanolom do oznake volumna.

Priprava topila_{Q10}

Kot topilo za pripravo vzorcev in standardnih raztopin smo pripravili mešanico n-heksana in brezvodnega etanola v razmerju 5:2 (v/v).

Priprava mobilne faze

Mobilno fazo smo pripravili iz acetonitrila, tetrahidrofurana in vode v razmerju 55:40:5 (v/v/v).

Priprava standardne raztopine ubidekarenona (oksidirane oblike koencima Q₁₀):

RS_{ubide.}

V 10,0 mL bučko smo natančno natehtali približno 10 mg standarda ubidekarenona, dodali $\frac{3}{4}$ volumna topila_{Q10} in raztapljanje pospešili s pomočjo ultrazvoka. Raztopino smo ohladili na sobno temperaturo in dopolnili s topilom_{Q10} do oznake volumna ter dobro premešali (RS_{ubide.}).

Priprava standardne raztopine α -tokoferola (vitamina E); RS _{α -tokof.}

V 10,0 mL bučko smo natančno natehtali približno 10 mg standarda α -tokoferola, dopolnili s topilom_{Q10} do oznake volumna ter dobro premešali (RS _{α -tokof.}).

Priprava standardne raztopine α -tokoferil acetata (vitamin E acetata); RS _{α -tokof.acet.}

V 10,0 mL bučko smo natančno natehtali približno 10 mg standarda α -tokoferil acetata, dopolnili s topilom_{Q10} do oznake volumna ter dobro premešali (RS _{α -tokof.acet.}).

Priprava raztopine mešanice standardov ubidekarenona in α -tokoferola; RS1

V 100,0 mL bučko smo odpipetirali 4,0 mL raztopine RS_{ubide.} in 2,0 mL raztopine RS _{α -tokof.}, dopolnili z brezvodnim etanolom do oznake volumna in dobro premešali (**RS1**). Standardno mešanico RS1 smo uporabili za vrednotenje **vzorcev 1 in 3**. Koncentracija ubidekarenona v standardu RS1 je bila približno 0,04 mg/mL in α -tokoferola približno 0,02 mg/mL.

Priprava raztopine mešanice standardov ubidekarenona in α -tokoferil acetata; RS2

V 100,0 mL bučko smo odpipetirali 4,0 mL raztopine RS_{ubide.} in 2,0 mL raztopine RS _{α -tokof.acet.}, dopolnili z brezvodnim etanolom do oznake volumna in dobro premešali (**RS2**). Standardno mešanico RS2 smo uporabili za vrednotenje **vzorcev 2 in 4**. Koncentracija ubidekarenona v standardu RS2 je bila približno 0,04 mg/mL in α -tokoferil acetata približno 0,02 mg/mL.

Sinteza standarda ubikinola (reducirane oblike koencima Q₁₀)

400 mg (0,46 mmol) ubidekarenona in 240 mg (1,36 mmol) L-askorbinske kisline smo natehtali v 25,0 mL bučko, dodali 10 mL brezvodnega etanola, predhodno prepihanega z argonom, ter segrevali 16 ur v Ar atmosferi pri 80 °C. Zmes smo nato ohladili na sobno temperaturo, prepihali z argonom in pustili v hladilniku čez noč. Izpadlo oborino smo odfiltrirali s presesavanjem, sprali z ohlajenim 96 % etanolom ter posušili pri znižanem tlaku. Dobili smo 320 mg (0,37 mmol, 80 % izk.) produkta, katerega strukturo smo potrdili z NMR spektroskopijo. Potek reakcije in izolacije smo spremljali s HPLC kromatografijo. Reducirano obliko smo shranjevali v hladilniku, zaščiteno pred zrakom in svetlobo.

Priprava standardne raztopine ubikinola (reducirane oblike koencima Q₁₀); RS3

V 10,0 mL bučko smo natančno natehtali približno 10 mg standarda ubikinola, dodali $\frac{3}{4}$ volumna topila_{Q₁₀} in raztapljanje pospešili s pomočjo ultrazvoka. Raztopino smo ohladili na sobno temperaturo in dopolnili s topilom_{Q₁₀} do oznake volumna ter dobro premešali (**RS_{ubiki.}**). V 50,0 mL merilno bučko smo odpipetirali 2,0 mL raztopne RS_{ubiki.}, dopolnili z brezvodnim etanolom do oznake volumna in dobro premešali (**RS3**). Standardno raztopino RS3 smo uporabimo za vrednotenje **vzorcev 1, 2, 3 in 4**. Koncentracija ubikinola v standardu RS3 je bila približno 0,04 mg/mL.

Priprava standardne raztopine koencima Q₉; RS_{Q9}

V 10,0 mL bučko smo natančno natehtali približno 10 mg standarda koencima Q₉, dodali $\frac{3}{4}$ volumna topila_{Q10} in raztapljanje pospešili s pomočjo ultrazvoka. Raztopino smo ohladili na sobno temperaturo in dopolnili bučko s topilom_{Q10} do oznake volumna ter dobro premešali (**RS_{Q9}**).

Priprava raztopine za preverjanje selektivnosti; RKS1

V 25,0 mL bučko smo odpipetirali 1,0 mL raztopine RS_{ubiki} in 1,0 mL raztopine RS_{ubide.}, dopolnili z brezvodnim etanolom do oznake volumna in dobro premešali (**RKS1**). Raztopino RKS1 smo uporabili za preverjanje ustreznosti ločbe kromatografskih vrhov ubdekarena in ubikinola.

Priprava raztopine za preverjanje selektivnosti; RKS2

V 25,0 mL bučko smo odpipetirali 1,0 mL raztopine RS_{Q9} in 1,0 mL raztopine RS_{ubide.}, dopolnili z brezvodnim etanolom do oznake volumna in dobro premešali (**RKS2**). Raztopino RKS2 smo uporabili za preverjanje ustreznosti ločbe kromatografskih vrhov koencima Q₉ in ubidekarena.

Priprava raztopine vzorca; RV_{Q10}

Za pripravo raztopin **vzorcev 1, 2 in 4** smo uporabili tri kapsule, za pripravo raztopine **vzorca 3** pa dve kapsuli, kar ustreza približno 100 mg ubidekarena. Kapsule smo prerezali z ostrimi škarjami in jih s pomočjo topila_{Q10} kvantitativno prenesli v 100,0 mL bučko, dodali $\frac{3}{4}$ volumna topila_{Q10} ter bučko postavili na ultrazvok za 30 minut. Raztopino smo ohladili na sobno temperaturo in dopolnili s topilom_{Q10} do oznake volumna ter dobro premešali. Del te raztopine smo centrifugirali 10 min na 3500 obratih/minuto. Naslednji korak priprave vzorca smo izvedli na dva načina:

1. V 50,0 mL bučko smo odpipetirali 2,0 mL bistrega supernatanta in dopolnili bučko z brezvodnim etanolom do oznake volumna ter dobro premešali (**RV1**). Raztopino vzorca RV1 smo uporabili za določitev vsebnosti ubidekarena, ubikinola, α -tokoferola in α -tokoferil acetata.
2. V 50,0 mL bučko smo odpipetirali 2,0 mL bistrega supernatanta, dodali 2,5 mL 0,1 % (m/v) raztopine FeCl₃ in dopolnili bučko z brezvodnim etanolom do oznake volumna ter

dobro premešali (**RV2**). Raztopino vzorca RV2 smo uporabili za določitev vsebnosti celokupnega koencima Q₁₀.

3.2.7 Kromatografski pogoji za metodo določanja vsebnosti ubidekarenona, ubikinola, α -tokoferola in α -tokoferil acetata

Kolona: Kromasil 100 C-18, 250 × 4.6 mm, 5 μ m delci (AKZO NOBEL, Nizozemska)

Pretok: 2 mL/min

Valovna dolžina: 280 nm (za detekcijo ubidekarenona in α -tokoferil acetata)

290 nm (za detekcijo ubikinola in α -tokoferola)

Volumen injiciranja: 15 μ L

Temperatura kolone: 25 °C

Mobilna faza: acetonitril/tetrahidrofuran/voda = 55/40/5 (v/v/v) → mobilno fazo smo filtrirali skozi 0,45 μ m membranski filter in degazirali z uporabo ultrazvoka

Pogoji za ustreznost kromatografskega sistema:

- ločljivost med vrhovoma ubidekarenona in Q₉ ter med vrhovoma ubidekarenona in ubikinola: $R \geq 2,5$
- faktor simetrije (*tailing*) za vrh ubidekarenona in vrh ubikinola: $\leq 1,5$
- ponovljivost med zaporednimi injiciranjem standardov: $RSD_3 \leq 2,0 \%$

3.2.8 Določanje vsebnosti ubidekarenona, ubikinola, α -tokoferola in α -tokoferil acetata v mehkih želatinastih kapsulah

Vsebnost spojin v vzorcih smo izračunali s pomočjo naslednjih enačb:

Vsebnost ubidekarenona v eni kapsuli:

Enačba 9:

$$m(\text{ubidekarenona}) / \text{kapsulo} = \frac{A_{\text{vz.ubide.}} \cdot c_{\text{st.ubide.}} \cdot F \cdot V_{\text{vz}}}{A_{\text{st.ubide.}} \cdot N}$$

$A_{\text{vz.ubide.}}$ površina kromatografskega vrha ubidekarenona v raztopini vzorca

$A_{\text{st.ubide.}}$ površina kromatografskega vrha ubidekarenona v raztopini standarda

$c_{\text{st.ubide.}}$ koncentracija ubidekarenona v raztopini standarda v mg/mL

N	število kapsul
F	faktor redčenja (2mL / 100mL)
V _{vz}	volumen raztopine vzorca v mL

Vsebnost ubikinola v eni kapsuli:

Enačba 10:

$$m(\text{ubikinola})/\text{kapsulo} = \frac{A_{\text{vz.ubiki.}} \cdot c_{\text{st.ubiki.}} \cdot F \cdot V_{\text{vz}}}{A_{\text{st.ubiki.}} \cdot N}$$

A _{vz.ubiki.}	površina kromatografskega vrha ubikinola v raztopini vzorca
A _{st.ubiki.}	površina kromatografskega vrha ubikinola v raztopini standarda
c _{st.ubiki.}	koncentracija ubikinola v raztopini standarda v mg/mL
N	število kapsul
F	faktor redčenja (2 mL / 100 mL)
V _{vz}	volumen raztopine vzorca v mL

Vsebnost α-tokoferola v eni kapsuli:

Enačba 11:

$$m(\alpha\text{-tokoferola})/\text{kapsulo} = \frac{A_{\text{vz.}\alpha\text{-tokof.}} \cdot c_{\text{st.}\alpha\text{-tokof.}} \cdot F \cdot V_{\text{vz}}}{A_{\text{st.}\alpha\text{-tokof.}} \cdot N}$$

A _{vz.α-tokof.}	površina kromatografskega vrha α-tokoferola v raztopini vzorca
A _{st.α-tokof.}	površina kromatografskega vrha α-tokoferola v raztopini standarda
c _{st.α-tokof.}	koncentracija α-tokoferola v raztopini standarda v mg/mL
N	število kapsul
F	faktor redčenja (2 mL / 100 mL)
V _{vz}	volumen raztopine vzorca v mL

Vsebnost α -tokoferil acetata v eni kapsuli:

Enačba 12:

$$m(\alpha\text{-tokoferil acetata})/\text{kapsulo} = \frac{A_{\text{vz.}\alpha\text{-tokof.acet.}} \cdot C_{\text{st.}\alpha\text{-tokof.acet.}} \cdot F \cdot V_{\text{vz}}}{A_{\text{Ast.}\alpha\text{-tokof.acet.}} \cdot N}$$

$A_{\text{vz.}\alpha\text{-tokof.acet.}}$ površina kromatografskega vrha α -tokoferil acetata v raztopini vzorca

$A_{\text{st.}\alpha\text{-tokof.acet.}}$ površina kromatografskega vrha α -tokoferil acetata v raztopini standarda

$C_{\text{st.}\alpha\text{-tokof.acet.}}$ koncentracija α -tokoferil acetata v raztopini standarda v mg/mL

N število kapsul

F faktor redčenja (100 mL / 2 mL)

V_{vz} volumen raztopine vzorca v mL

4. REZULTATI

4.1 Validacija analizne metode določanja vsebnosti askorbinske kisline v mehkih želatinastih kapsulah

Metodo smo validirali v skladu z ICH smernico Q2(R1) (32). Parametri, ki smo jih ovrednotili, so: natančnost (kot ponovljivost HPLC sistema), točnost, linearnost in stabilnost raztopin. Natančnosti metode nismo vrednotili zaradi samega načina priprave vzorca, saj vsebnost ASK med posameznimi kapsulami variira, tako da nismo imeli na voljo homogenega vzorca, s katerim bi izvedli več paralelnih določitev.

4.1.1 Natančnost (ponovljivost HPLC sistema)

Natančnost (ponovljivost) HPLC sistema smo določili s standardnim odmikom (SD) in relativnim standardnim odmikom (RSD) odzivov šestih zaporednih injiciranj iste standardne raztopine s koncentracijo 0,08 mg/mL ($RS_{ASK}(3.2.2)$).

Preglednica II: Natančnost (ponovljivost) HPLC sistema za standardno raztopino s koncentracijo 0,08 mg/mL.

Zap. število injiciranja (n)	Površina vrha ASK v mAUs
1	2982,08
2	2978,32
3	2975,69
4	2973,17
5	2974,59
6	2969,65
Φ (povprečna vrednost)	2975,58
SD	4,2830
RSD %	0,14

4.1.2 Točnost metode

Točnost metode smo določili tako, da smo **vzorcu 1** (3.1.4), ki ni vseboval askorbinske kisline (placebo), dodali določeno količino standarda askorbinske kisline (40, 80 ali 120 mg), ki je ustrezala 50, 100 in 150 % pričakovane povprečne vsebnosti v eni kapsuli vzorcev, ki smo jih vrednotili. Vsako koncentracijo smo pripravili v treh ponovitvah po

postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.3. Točnost smo podali kot izkoristek med izmerjeno in dejansko vsebnostjo, odstopanje od prave vrednosti in ponovljivost (RSD).

Preglednica III: Točnost metode v območju okrog 50 % pričakovane povprečne vsebnosti askorbinske kisline v kapsuli.

Število določanja (n)	Dodana količina ASK v mg μ_i	Določena količina ASK v mg x_i	Odstopanje (<i>bias</i>) $\frac{x_i - \mu_i}{\mu_i} \cdot 100$ (%)	Izkoristek (<i>recovery</i>) (%)
1	40,154	39,927	-0,57	99,43
2	40,165	40,253	0,22	100,22
3	40,133	40,157	0,06	100,06
Φ				99,90
odstopanje (%)				s=0,4177
RSD (%)				0,42

Preglednica IV: Točnost metode v območju okrog 100 % pričakovane povprečne vsebnosti askorbinske kisline v kapsuli.

Število določanja (n)	Dodana količina ASK v mg μ_i	Določena količina ASK v mg x_i	Odstopanje (<i>bias</i>) $\frac{x_i - \mu_i}{\mu_i} \cdot 100$ (%)	Izkoristek (<i>recovery</i>) (%)
1	80,335	80,189	-0,18	99,82
2	80,162	80,098	-0,08	99,92
3	80,133	79,905	-0,28	99,72
Φ				99,82
odstopanje (%)				s=0,1000
RSD (%)				0,10

Preglednica V: Točnost metode v območju okrog 150 % pričakovane povprečne vsebnosti askorbinske kisline v kapsuli.

Število določanja (n)	Dodana količina ASK v mg μ_i	Določena količina ASK v mg x_i	Odstopanje (<i>bias</i>) $\frac{x_i - \mu_i}{\mu_i} \cdot 100$ (%)	Izkoristek (<i>recovery</i>) (%)
1	120,210	120,236	0,02	100,02
2	120,167	120,732	0,47	100,47
3	120,205	120,311	0,09	100,09
Φ				100,19
odstopanje (%)				s=0,2421
RSD (%)				0,24

Vsi izkoristki so bili znotraj 100 ± 2 %, kar nam potrjuje, da je metoda točna in primerna za določanje vsebnosti ASK v mehkih želatinastih kapsulah.

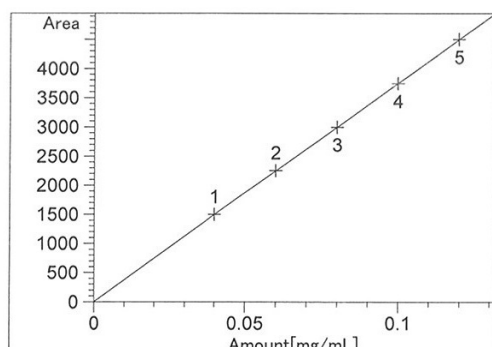
4.1.3 Linearnost

Za določitev linearnosti smo pripravili pet standardnih raztopin askorbinske kisline (poglavje 3.2.3) v koncentracijah 0,04, 0,06, 0,08, 0,10 in 0,12 mg/mL, kar ustreza 20, 60, 80, 100 in 120 mg askorbinske kisline v vzorcu. Vsako standardno raztopino smo trikrat injicirali. Izračunali smo regresijsko premico na podlagi povprečnih površin askorbinske kisline v odvisnosti od koncentracij v območju od 50 % do 150 % delovne koncentracije.

Preglednica VI: Površine vrhov standardnih raztopin askorbinske kisline v območju od 0,04 do 0,12 mg/mL.

Točka v umeritveni krivulji	konc. ASK v mg/mL	AUC v mAU
1.	0,04	1503,35
		1500,91
		1499,80
Povprečna AUC v mAU		1501,35
Točka v umeritveni krivulji	konc. ASK v mg/mL	AUC v mAU
2.	0,06	2255,58
		2255,38
		2253,33
Povprečna AUC v mAU		2254,76
Točka v umeritveni krivulji	konc. ASK v mg/mL	AUC v mAU
3.	0,08	3001,34
		3001,64
		2999,29
Povprečna AUC v mAU		3000,76

Točka v umeritveni krivulji	konc. ASK v mg/mL	AUC v mAU
4.	0,10	3749,61
		3745,80
		3746,08
Povprečna AUC v mAU		3747,16
Točka v umeritveni krivulji	konc. ASK v mg/mL	AUC v mAU
5.	0,12	4504,32
		4502,46
		4503,38
Povprečna AUC v mAU		4503,39



ASK at exp. RT: 5.442
 MWD1 A, Sig=245,4 Ref=550,25
 Correlation: 1.00000
 Residual Std. Dev.: 3.28257
 Formula: $y = mx + b$
 m: 37482.36653
 b: 2.89655
 x: Amount
 y: Area

$$A = 37483 \cdot c + 3$$

Slika 16: Odvisnost površine od koncentracije askorbinske kisline v območju od 0,04 do 0,12 mg/mL in enačba regresijske premice.

Korelacijski koeficient (r^2) je $\geq 0,99$, kar dokazuje, da je metoda v koncentracijskem območju od 0,04 do 0,12 mg/mL (v območju od 50 do 150 % delovne koncentracije) linearna in primerna za določanje vsebnosti ASK v mehkih želatinastih kapsulah.

4.2 Vsebnosti ubidekarena, ubikinola, α -tokoferola, α -tokoferil acetata in askorbinske kisline v vzorcih mehkih želatinastih kapsul

Kapsule, ki smo jih vrednotili, so imele različno sestavo in so bile od različnih proizvajalcev. Vse pa so bile v obliki mehkih želatinastih kapsul z učinkovinami raztopljenimi ali suspendiranimi v oljnem vehiklu (odvisno od lipofilnega oz. hidrofilnega značaja učinkovine).

Vsem vzorcem smo določili vsebnost učinkovin (samo tistih, ki smo jih želeli spremljati) na začetku, preden smo jih izpostavili različnim pogojem shranjevanja, nato pa po 1, 2, 3, 4 in 6 tednih. Vse štiri vzorce smo 6 tednov umetno starali v klimatskih komorah pod naslednjimi pogoji:

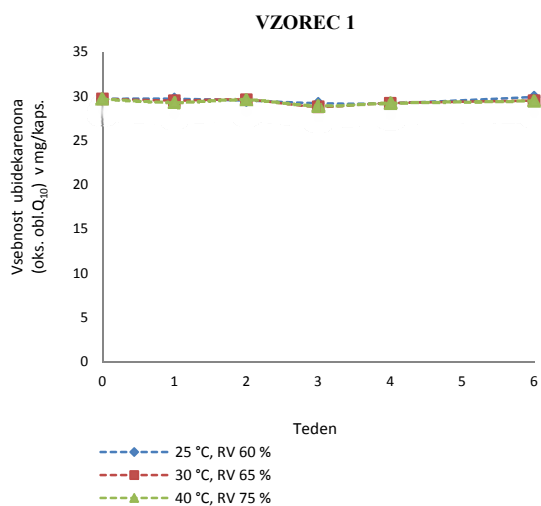
- 25 °C /RV 60%
- 30 °C /RV 65%
- 40 °C /RV 75%

Pred vrednotenjem vzorcev smo vsakič preverili ustreznost kromatografskega sistema tako, da smo preverili ločljivost, ki izkazuje sposobnost sistema za zadovoljivo ločbo dveh spojin, asimetrijo vrhov ("tailing"), ki izraža popačenje kromatografskega vrha, natančnost injiciranja pa smo potrdili z ustreznim RSD-jem treh injiciranj iste standardne raztopine. Kriteriji ustreznosti so zapisani v poglavju 3.2.7 za vrednotenje vsebnosti ubidekarena, ubikinola, α -tokoferola in α -tokoferil acetata in v poglavju 3.2.4 za vrednotenje vsebnosti askorbinske kisline.

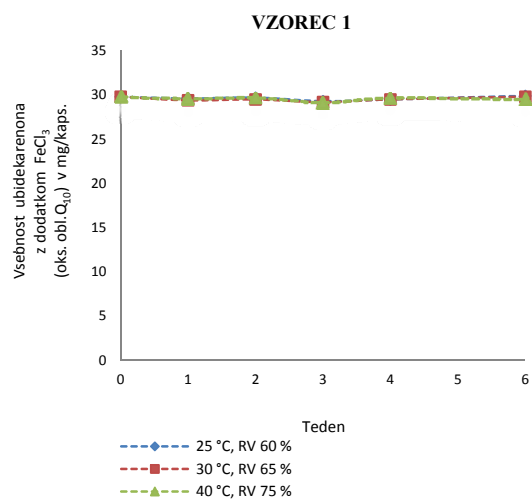
V preglednicah od VII do X so podane vsebnosti učinkovin, ki smo jih določili v vzorcih tekom procesa staranja pri prej navedenih pogojih.

Preglednica VII: Vsebnosti ubidekarenona, ubikinola in celokupnega koencima Q₁₀ v vzorcu 1, katerega deklarirana vsebnost je 30 mg koencima Q₁₀.

		Vseb. ubidekarenona (oks.obl.Q ₁₀) v mg/kaps.		Vseb. ubikinola (red.obl.Q ₁₀) v mg/kaps.		Vseb. ubidekarenona (oks.obl.Q ₁₀) po dod. FeCl ₃ v mg/kaps.	
Začetno stanje		29,64	29,75	/	/	29,67	29,85
po 1. tednu	25 °C, RV 60 %	29,66	/	/	/	/	29,57
	30 °C, RV 65 %	29,45	/	/	/	/	29,42
	40 °C, RV 75 %	29,33	/	/	/	/	29,46
po 2. tednu	25 °C, RV 60 %	29,51	/	/	/	/	29,72
	30 °C, RV 65 %	29,55	/	/	/	/	29,53
	40 °C, RV 75 %	29,57	/	/	/	/	29,57
po 3. tednu	25 °C, RV 60 %	29,21	/	/	/	/	29,28
	30 °C, RV 65 %	28,81	/	/	/	/	29,20
	40 °C, RV 75 %	28,88	/	/	/	/	29,13
po 4. tednu	25 °C, RV 60 %	29,18	/	/	/	/	29,48
	30 °C, RV 65 %	29,23	/	/	/	/	29,45
	40 °C, RV 75 %	29,21	/	/	/	/	29,55
po 6. tednu	25 °C, RV 60 %	29,89	/	/	/	/	29,89
	30 °C, RV 65 %	29,49	/	/	/	/	29,80
	40 °C, RV 75 %	29,49	/	/	/	/	29,50



(a)



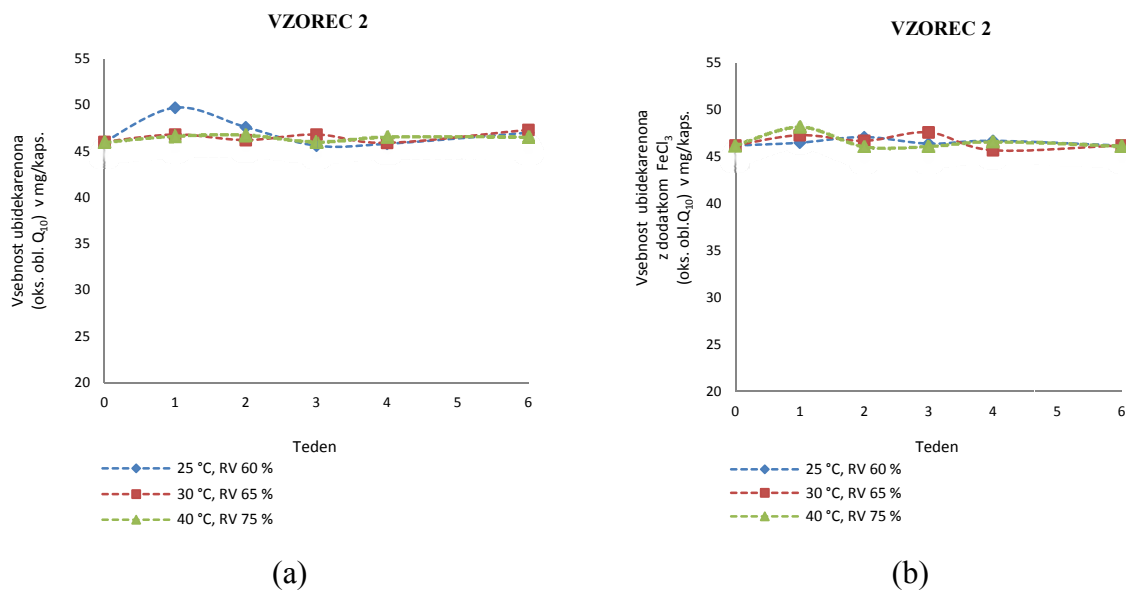
(b)

Slika 17: Vsebnost ubidekarenona v vzorcu 1 v primeru priprave vzorcev brez (a) in z dodatkom (b) FeCl₃ tekom procesa umetnega staranja pri različnih pogojih.

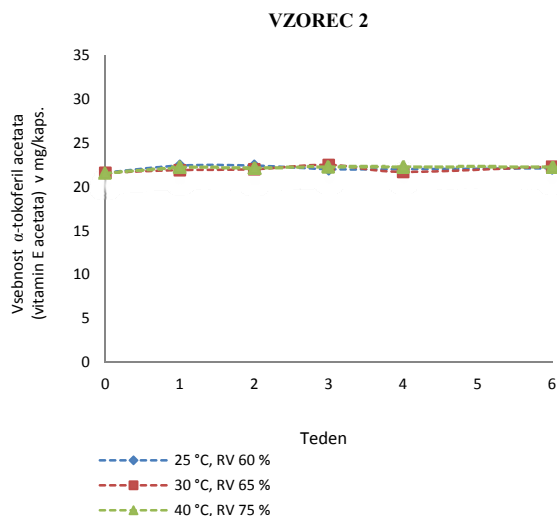
Iz preglednice VII in slike 17 je razvidno, da v primeru, ko kapsule vsebujejo le koencim Q₁₀ ne pride do sprememb v vsebnosti ubidekarenona tekom procesa umetnega staranja kapsul pri nobenih stresnih pogojih temperature in relativne vlage. Ker smo predvidevali, da dodatek FeCl₃ pri tem vzorcu ne vpliva na vsebnost ubidekarenona, smo za vsako določitev izvedli samo eno paralelo. Dobljeni rezultati nam potrjujejo, da je sam ubidekarenon v mehkih želatinastih kapsulah stabilen pri preučevanih pogojih in da njegova vsebnost ni odvisna od načina priprave vzorca.

Preglednica VIII: Vsebnost ubidekarenona, ubikinola, celokupnega koencima Q₁₀ in α-tokoferil acetata v **vzorcu 2**, katerega deklarirana vsebnost je 50 mg koencima Q₁₀ in 20 mg E vitamin acetata.

		Vseb. ubidekarenona (oks.obl.Q ₁₀) v mg/kaps.		Vseb. ubikinola (red.obl.Q ₁₀) v mg/kaps.		Vseb. ubidekarenona (oks.obl.Q ₁₀) po dod. FeCl ₃ v mg/kaps.		Vseb. α-tokoferil acet. (vitmin E acet.) v mg/kaps.	
začetno stanje		46,05	45,92	/	/	46,19	46,18	21,61	21,49
po 1. tednu	25 °C, RV 60 %	49,73	/	/	/	/	46,47	23,13	21,69
	30 °C, RV 65 %	46,83	/	/	/	/	47,25	21,82	22,00
	40 °C, RV 75 %	46,56	/	/	/	/	48,17	21,84	22,59
po 2. tednu	25 °C, RV 60 %	47,58	/	/	/	/	47,05	22,58	22,23
	30 °C, RV 65 %	46,20	/	/	/	/	46,70	21,86	22,12
	40 °C, RV 75 %	46,74	/	/	/	/	46,08	22,28	21,86
po 3. tednu	25 °C, RV 60 %	45,64	/	/	/	/	46,39	21,88	22,13
	30 °C, RV 65 %	46,78	/	/	/	/	47,64	22,38	22,70
	40 °C, RV 75 %	45,99	/	/	/	/	46,13	22,29	22,21
po 4. tednu	25 °C, RV 60 %	45,84	/	/	/	/	46,74	21,75	22,17
	30 °C, RV 65 %	45,85	/	/	/	/	45,65	21,67	21,72
	40 °C, RV 75 %	46,50	/	/	/	/	46,63	22,35	22,34
po 6. tednu	25 °C, RV 60 %	47,01	/	/	/	/	46,19	22,37	21,89
	30 °C, RV 65 %	47,30	/	/	/	/	46,18	22,52	22,08
	40 °C, RV 75 %	46,51	/	/	/	/	46,06	22,34	22,06



Slika 18: Vsebnost ubidekarenona v **vzorcu 2** v primeru priprave vzorcev brez (a) in z dodatkom (b) $FeCl_3$ tekom procesa umetnega staranja pri različnih pogojih.



Slika 19: Vsebnost α -tokoferil acetata v **vzorcu 2** tekom procesa umetnega staranja pri različnih pogojih.

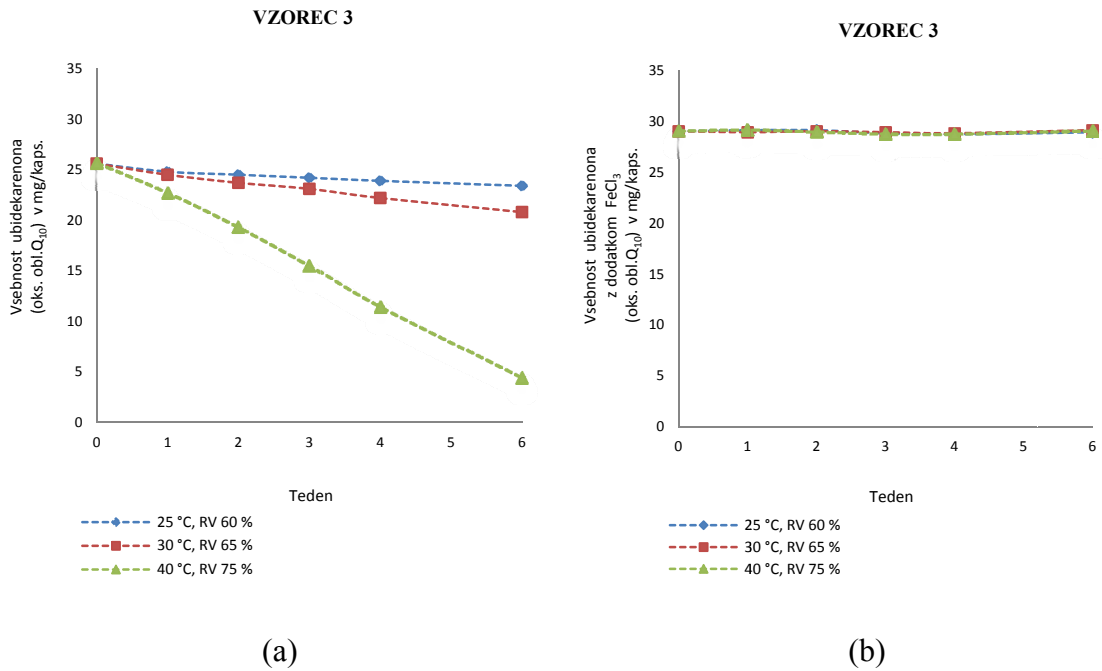
Iz preglednice VIII ter slik 18 in 19 se vidi, da hkratna prisotnost ubidekarenona in α -tokoferil acetata ne povzroči medsebojnih interakcij med tema spojinama, kar se odraža na konstantni vsebnosti obeh spojin skozi celoten proces umetnega staranja pri vseh uporabljenih pogojih.

Preglednica IX: Vsebnost ubidekarenona, ubikinola, celokupnega koencima Q₁₀, α-tokoferola in askorbinske kisline v vzorcu 3, katerega deklarirana vsebnost je 30 mg koencima Q₁₀, 16,1 mg E vitamina in 33 mg C vitamina.

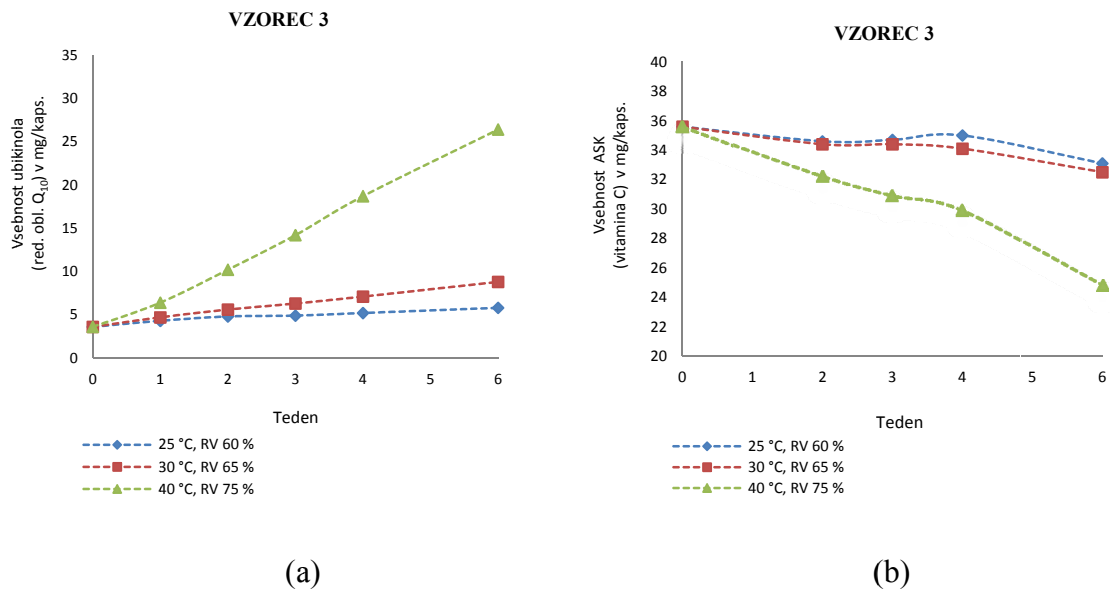
		Vseb. ubidekarenona (oks.obl.Q ₁₀) v mg/kaps.		Vseb. ubikinola (red.obl.Q ₁₀) v mg/kaps.		Vseb. ubidekarenona (oks.obl.Q ₁₀) po dod. FeCl ₃ v mg/kaps.		Vseb. ASK (vitamina C) v mg/kaps.		Vseb. α-tokoferola (vitamina E) v mg/kaps.	
začetno stanje		25,47	25,64	3,53	3,62	28,92	29,00	35,75	35,42	15,61	15,71
po 1. tednu	25 °C, RV 60 %	24,82	24,79	4,26	4,36	29,14	29,13	■33,35	■33,96	15,70	15,77
	30 °C, RV 65 %	24,52	24,47	4,67	4,70	28,89	29,00	■32,93	■32,47	15,74	15,73
	40 °C, RV 75 %	22,75	22,70	6,50	6,37	29,21	28,97	■32,89	■32,86	15,79	15,71
po 2. tednu	25 °C, RV 60 %	24,53	24,54	4,78	4,83	29,23	29,02	34,64	34,52	15,83	15,86
	30 °C, RV 65 %	23,74	23,75	5,55	5,57	29,01	29,04	34,62	34,17	15,80	15,81
	40 °C, RV 75 %	19,30	19,37	10,07	10,28	28,95	28,86	32,69	31,68	15,74	15,79
po 3. tednu	25 °C, RV 60 %	24,12	24,25	4,97	4,79	28,62	28,89	34,66	34,79	15,85	15,86
	30 °C, RV 65 %	23,05	23,05	6,28	6,22	28,93	28,95	33,94	34,88	15,90	15,87
	40 °C, RV 75 %	15,60	15,30	14,06	14,26	28,63	28,79	30,80	30,94	15,67	15,72
po 4. tednu	25 °C, RV 60 %	23,86	23,87	5,14	5,33	28,57	28,92	34,65	35,26	15,87	15,91
	30 °C, RV 65 %	22,13	22,24	7,04	7,12	28,87	28,67	34,12	-*	15,81	15,96
	40 °C, RV 75 %	11,36	11,53	18,91	18,40	28,81	28,60	29,69	30,08	15,88	15,78
po 6. tednu	25 °C, RV 60 %	23,48	23,39	5,79	5,80	28,89	29,00	33,32	32,82	15,77	15,64
	30 °C, RV 65 %	20,95	20,59	8,54	9,03	29,25	29,01	32,40	32,59	15,76	15,75
	40 °C, RV 75 %	4,55	4,29	26,28	26,43	28,90	29,01	24,11	25,49	15,68	15,65

■Nižji rezultat zaradi uporabe neustreznih lijev ločnikov, s katerimi nismo dobili ustrezne ločbe med heksansko in vodno fazo. Ti rezultati niso realni.

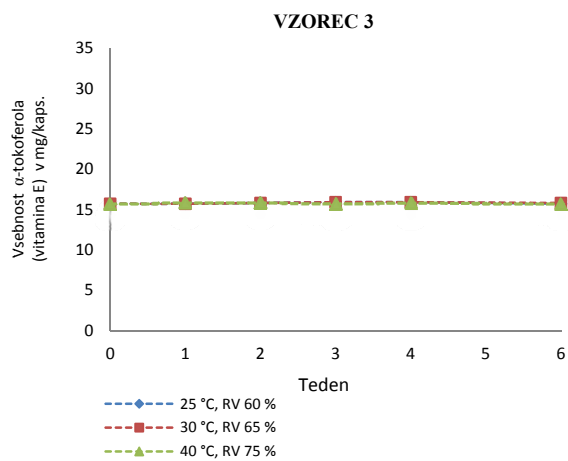
*Izguba vzorca med pripravo.



Slika 20: Vsebnost ubidekarenona v **vzorcu 3** v primeru priprave vzorcev brez (a) in z dodatkom (b) $FeCl_3$ tekom procesa umetnega staranja pri različnih pogojih.



Slika 21: Vsebnost ubikinola (a) in askorbinske kisline (b) v **vzorcu 3** tekom procesa umetnega staranja pri različnih pogojih.

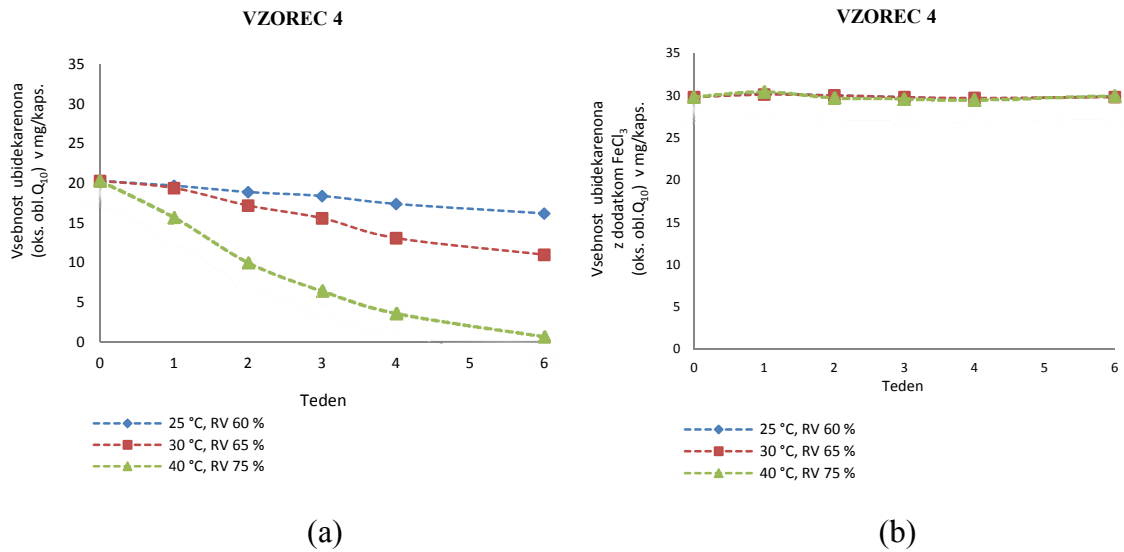


Slika 22: Vsebnost α -tokoferola v **vzorcu 3** tekom procesa umetnega staranja pri različnih pogojih.

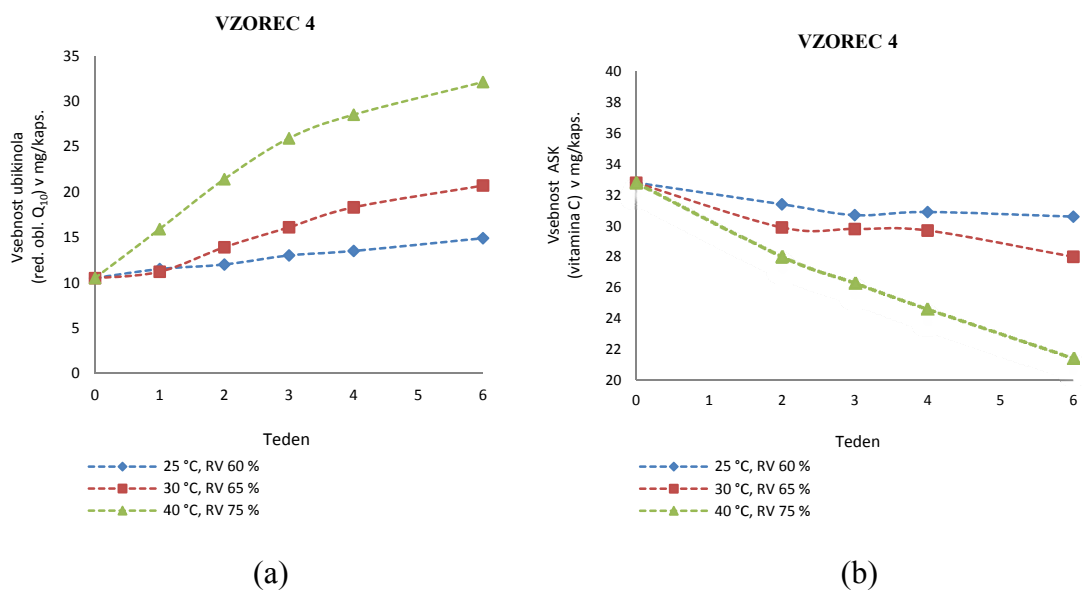
Preglednica X: Vsebnost ubidekarenona, ubikinola, celokupnega koencima Q₁₀, α -tokoferil acetata in askorbinske kisline v vzorcu 4, katerega deklarirana vsebnost je 30 mg koencima Q₁₀, 24 mg E vitamin acetata in 40 mg C vitamina.

		Vseb. ubidekarenoa (oks.obl.Q ₁₀) v mg/kaps.		Vseb. ubikinola (red.obl.Q ₁₀) v mg/kaps.		Vseb. ubidekarenoa (oks.obl.Q ₁₀) po dod. FeCl ₃ v mg/kaps.		Vseb. ASK (vitamina C) v mg/kaps.		Vseb. α -tokoferil acet. (vitmin Eacet.) v mg/kaps.	
začetno stanje		20,37	20,27	10,46	10,44	30,12	29,48	32,58	32,95	33,98	33,81
po 1.tednu	25 °C, RV 60 %	19,83	19,53	11,42	11,57	30,29	30,13	■27,73	■26,25	34,32	34,41
	30 °C, RV 65 %	19,24	19,54	11,34	11,90	29,65	30,57	■29,84	■26,85	33,45	34,46
	40 °C, RV 75 %	15,76	15,58	15,85	15,97	30,55	30,30	■27,78	■26,01	34,66	34,13
po 2.tednu	25 °C, RV 60 %	18,83	19,03	11,96	12,09	29,83	30,12	31,89	30,93	34,14	34,86
	30 °C, RV 65 %	17,28	17,11	13,77	14,10	29,98	29,98	30,56	29,18	34,29	34,85
	40 °C, RV 75 %	9,96	10,12	21,65	21,22	29,64	29,66	28,37	27,63	34,83	34,05
po 3.tednu	25 °C, RV 60 %	18,19	18,57	12,86	13,06	29,38	30,12	30,02	31,30	34,16	34,95
	30 °C, RV 65 %	15,68	15,55	16,51	15,72	29,97	29,62	29,21	30,47	34,56	33,95
	40 °C, RV 75 %	6,40	6,39	25,68	26,15	29,37	29,80	26,62	25,96	33,82	34,57
po 4.tednu	25 °C, RV 60 %	17,50	17,37	13,58	13,40	29,79	29,37	30,69	31,15	34,42	34,19
	30 °C, RV 65 %	13,19	12,98	18,31	18,27	29,81	29,53	29,54	29,80	33,97	34,23
	40 °C, RV 75 %	3,55	3,61	28,49	28,48	29,51	29,43	24,75	24,49	34,08	33,83
po 6.tednu	25 °C, RV 60 %	16,28	16,20	14,69	15,09	29,75	29,97	30,42	30,69	34,17	34,32
	30 °C, RV 65 %	11,05	10,90	20,83	20,57	29,82	29,77	27,64	28,42	34,52	34,56
	40 °C, RV 75 %	0,83	0,66	32,21	32,05	29,92	29,78	21,38	21,37	34,68	34,33

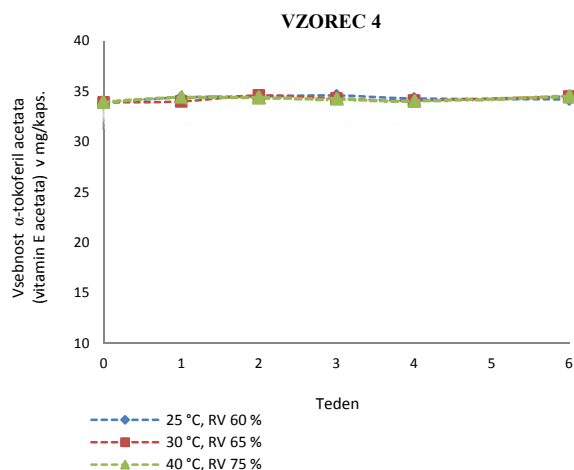
■Nižji rezultat zaradi uporabe neustreznih lijev ločnikov, s katerimi nismo dobili ustrezne ločbe med heksansko in vodno fazo. Ti rezultati niso realni.



Slika 23: Vsebnost ubidekarenona v vzorcu 4 v primeru priprave vzorcev brez (a) in z dodatkom (b) $FeCl_3$ tekem procesa umetnega staranja pri različnih pogojih.



Slika 24: Vsebnost ubikinola (a) in askorbinske kisline (b) v vzorcu 4 tekem procesa umetnega staranja pri različnih pogojih.



Slika 25: Vsebnost α -tokoferil acetata v **vzorcu 4** tekom procesa umetnega staranja pri različnih pogojih.

Pri **vzorcih 3** in **4** smo ugotovili, da vsebnost ubidekarenona ob pripravi vzorca brez dodatka raztopine FeCl_3 pri vseh pogojih staranja pada (sliki 20a in 23a), vsebnost ubikinola pa z enako hitrostjo narašča (sliki 21a in 24a). Hkrati je viden tudi upad vsebnosti askorbinske kisline (sliki 21b in 24b), vendar ta ni tako znaten, saj ubidekarenon in askorbinska kislina med seboj reagirata v razmerju 1 : 1, kar glede na razmerje njunih molskih mas ($M_{\text{ASK}}/M_{\text{ubide.}} = 176,1/863$) pomeni, da 1 mg ASK reducira 4,90 mg ubidekarenona. Pričakovano je bila hitrost upadanja vsebnosti ubidekarenona in ASK najvišja pri pogoju 40 °C /RV 75 %, kjer je po 6 tednih zreagirala skoraj ves ubidekarenon. V primeru, ko pa smo vzorcu dodali raztopino FeCl_3 , je le ta ves nastali ubikinol oksidiral nazaj v ubidekarenon. Tako je bila njegova celokupna vsebnost tekom vseh šestih tednov konstantna (sliki 20b in 23b).

Prav tako kot pri prejšnjih dveh vzorcih se vsebnost α -tokoferola v **vzorcu 3** (slika 22) in vsebnost α -tokoferil acetata v **vzorcu 4** (slika 25) nista znatno spreminjali.

5. RAZPRAVA

5.1 Razvoj analizne metode za določanje vsebnosti askorbinske kisline v mehkih želatinastih kapsulah

Za določitev vsebnosti askorbinske kisline smo iskali HPLC metodo, ki bi ustrezala našim vzorcem in razpoložljivi opremi. Članek (38) opisuje metodo določanja askorbinske in dehidroaskorbinske kisline v hrani in bioloških vzorcih. Kot ekstrakcijsko topilo je navedena raztopina 1 % (m/v) *meta*-fosforjeve kisline (MPA) in 0,5 % (m/v) oksalne kisline s pH = 2. MPA zagotavlja kisel pH, kar poveča stabilnost askorbinske kisline, ki je pri tem pH v neionizirani obliki, oksalna kislina pa kompleksira morebitne prisotne Fe²⁺ in Cu²⁺ ione (deluje kot kelator). Da bi še dodatno poskrbeli za stabilnost askorbinske kisline med samo pripravo vzorca, je potrebno vsa topila, ki jih uporabljamo, degazirati na ultrazvočni kopeli s čimer iz topil odstranimo raztopljen kisik. Za vrednotenje vsebnosti askorbinske kisline je v članku uporabljena HPLC metoda z UV ali elektrokemijskim detektorjem, za določitev dehidroaskorbinske kisline pa HPLC metoda s po-kolonsko derivatizacijo in fluorescenčnim detektorjem. Ker smo imeli na voljo le HPLC sistem z UV detektorjem, smo se odločili zgolj za vrednotenje askorbinske kisline.

Mobilno fazo za HPLC kromatografijo smo povzeli po članku (39), kjer je kot mobilna faza naveden 50 mM fosfatni pufer s pH=3 (pH uravnan s H₃PO₄). V našem primeru smo mobilno fazo nekoliko modificirali in fosfatnemu pufri dodali 2 % (v/v) metanola, s čimer smo skrajšali čas elucije.

Oba članka navajata analitsko kolono C18, 250×4,6 mm I.D. s 5µm delci. Preizkusili smo več analitski kolon pri različnih pretokih, rezultati pa so podani v preglednici XI. Vrednotili smo standardno raztopino askorbinske kisline v topilu s koncentracijo 0,08 mg/mL (RS_{ASK}(3.2.2)).

Preglednica XI: Kromatografski parametri dobljeni z različnimi analitskimi kolonami in različnimi pretoki mobilne faze.

Analitska kolona	Pretok v mL/min	Ločljivost med ASK in oksalno kislino	Faktor simetrije vrha ASK	Št. teoretskih podov vrha ASK
Zorbax ODS 150 × 4,6 mm, 5 µm delci	1,0	3,6	1,5	2634
	0,8	3,9	1,5	3148
	0,7	4,1	1,5	3353
Zorbax Eclipse XDB-C18 150 × 4,6 mm, 5 µm delci	1,0	nismo dobili ločbe, zato je nismo dalje preizkušali		
Luna C18(2) 100A 250 × 4,6 mm, 5 µm delci	1,0	10,2	1,1	12457
	0,8	11,4	1,1	14335

Glede na dobljene rezultate smo se odločili za uporabo analitske kolone Luna C18(2) 100A 250×4,6 mm s 5 µm delci in pretok 0,8 mL/min. Celoten postopek priprave vzorcev, raztopin, standardnih raztopin ter kromatografski pogoji, ki smo jih uporabili pri vrednotenju askorbinske kisline v vzorcih, so natančno opisani v poglavjih 3.2.2 in 3.2.4.

5.2 Modifikacije USP metode določanja vsebnosti ubidekarenona v kapsulah

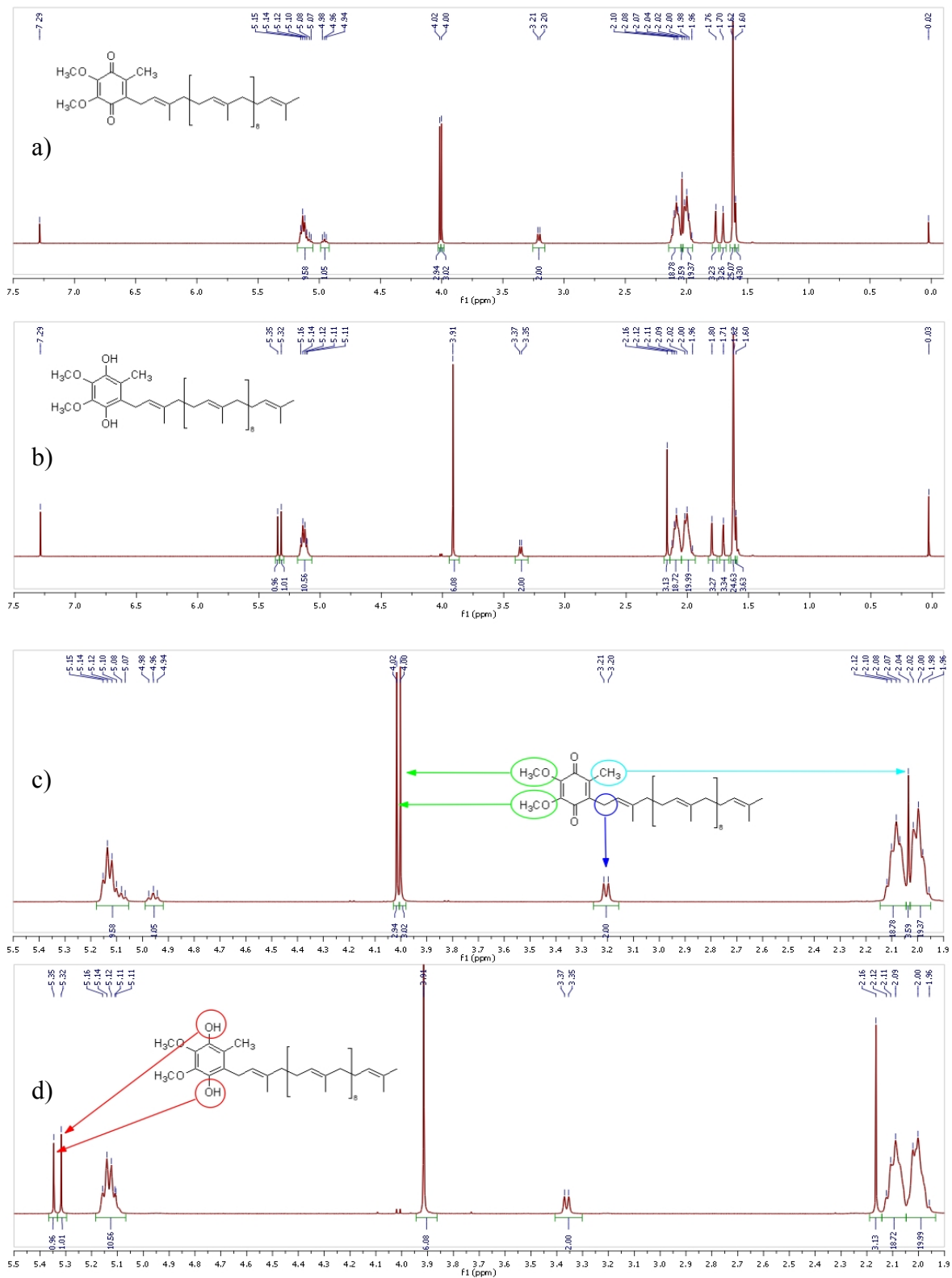
USP monografija za določanje vsebnosti ubidekarenona v kapsulah je povzeta po AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*) metodi za določanje koencima Q₁₀ v živilih in prehranskih dopolnilih (40). Metoda tako določa celokupen Q₁₀ v obliki ubidekarenona. Mi pa smo želeli dokazati, da v primeru hkratne prisotnosti ubidekarenona in askorbinske kisline pride do medsebojne reakcije, pri čemer ubidekarenon askorbinska kislina reducira v ubikinol. Hkrati smo želeli preveriti, če tudi v primeru, ko sta v kapsulah prisotna ubidekarenon in α-tokoferol oz. α-tokoferil acetat, pride do medsebojnih interakcij. Tako smo za vrednotenje vsebnosti ubidekarenona, ubikinola, α-tokoferola in α-tokoferil acetata uporabili obstoječo metodo določanja ubidekarenona v kapsulah po ameriški farmakopeji (USP) z manjšimi modifikacijami, ki so naslednje:

- Za pripravo raztopine vzorca smo uporabili število kapsul, ki ustreza približno 100 mg ubidekarenona namesto predpisanih 200 mg in kapsule s pomočjo topila prenesli v 100,0 mL bučko namesto v 200,0 mL bučko. To smo storili, da smo zmanjšali število potrebnih kapsul.

- Da smo lahko dokazali, da dodatek 0,1 % (m/v) raztopine FeCl₃ pretvori ubikinol nazaj v ubidekarenon, smo eno pripravo vzorca naredili z dodatkom raztopine FeCl₃ in drugo brez dodatka.
- Zaradi večje natančnosti redčenja smo redčili 2,0 mL raztopine vsebine kapsul z etanolom na 50,0 mL, namesto 1,0 mL na 25,0 mL.
- Ker nismo imeli na voljo analitske kolone opisane v monografiji (8 mm x 10 cm), smo uporabili kolono drugih dimenzij z enako stacionarno fazo (C18) in velikostjo delcev (5 µm) ter prilagodili pretok mobilne faze (namesto pretoka 2,5 mL/min smo uporabili pretok 2,0 mL/min).

5.3 Določanje vsebnosti ubikinola, α -tokoferola in α -tokoferil acetata

Reducirana oblika koencima Q₁₀ (ubikinol) je pri običajnih pogojih precej oz. zelo nestabilna, saj je nagnjena k hitri oksidaciji (že ob minimalni prisotnosti atmosferskega O₂) do ubidekarena. Standard ubikinola tako na tržišču ni na voljo. Tudi pregled literature je pokazal, da avtorji za vrednotenje ubikinola le-tega največkrat pripravijo neposredno pred uporabo, tako da raztopini ubidekarena dodajo ustrezen reducent, npr. natrijev borhidrid (NaBH₄). V našem primeru smo za redukcijo uporabili askorbinsko kislino v skladu s postopkom iz japonskega patenta (41). Sama redukcija je potekla relativno hitro, nastanek dihidroksi derivata pa smo potrdili z NMR spektroskopijo (slika 26).



Slika 26: ^1H NMR spektra ubidekarenona (a) in kinola (b), nastalega pri redukciji (400 MHz, topilo CDCl_3). Spodaj (c in d) so prikazane najočitnejše razlike med signali ter katerim protonom le-ti pripadajo.

Več težav kot s samo sintezo smo imeli z izolacijo in s shranjevanjem kinola, saj oksidacija nazaj v kinon poteka zelo hitro. Ker se je vsebnost kinolne oblike v standardu tekom eksperimentalnega dela zmanjševala, smo čistost standarda vsakokrat določili tako, da smo določili maso ubidekarenona s pomočjo standarda $RS_{ubide.}$ in jo odšteli od celokupne mase standarda ubikinola (enačba 13 in 14).

Enačba 13:

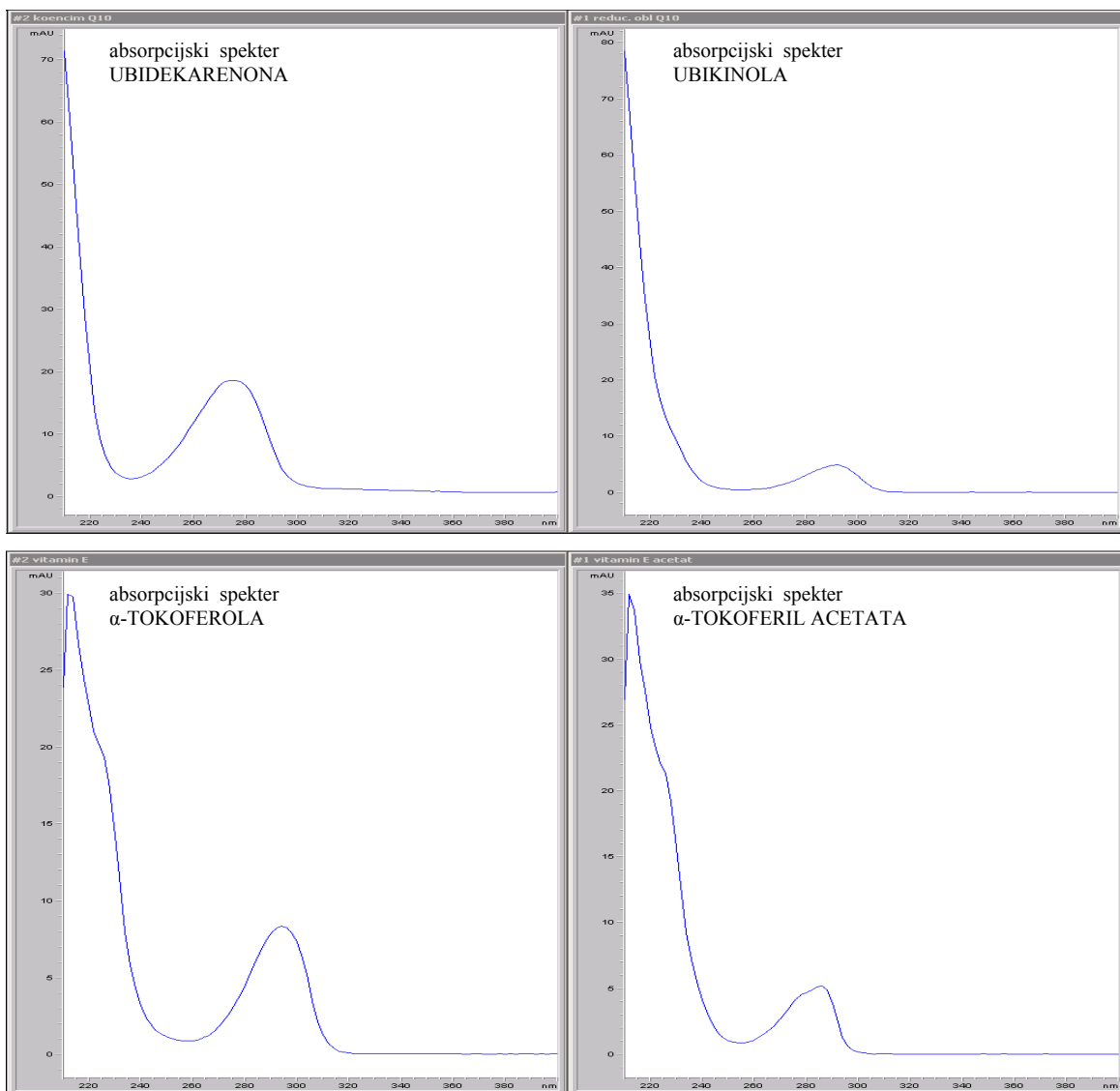
$$m_{ubide.} = \frac{A_{ubiki.,280nm}}{A_{ubide.,280nm}} \cdot c_{ubide.} \cdot V$$

Enačba 14:

$$\text{vsebnost ubikinola (\%)} = \frac{m_{\text{standarda ubiki.}} - m_{ubide.}}{m_{\text{standarda ubiki.}}} \cdot 100$$

$m_{ubide.}$	masa ubidekarenona v raztopini $RS_{ubiki.}$
$m_{\text{standarda ubiki.}}$	celokupna masa standarda ubikinola v raztopini $RS_{ubiki.}$
$A_{ubiki.,280nm}$	površina kromatografskega vrha ubidekarenona v raztopini $RS_{ubiki.}$
$A_{ubide.,280nm}$	površina kromatografskega vrha ubidekarenona v raztopini $RS_{ubide.}$
$c_{ubide.}$	koncentracija ubidekarenona v raztopini standarda $RS_{ubide.}$
V	faktor redčenja (4 mL/10 mL)
vsebnost ubikinola	čistost standarda ubikinola v %

Posneli smo absorpcijska spektra ubidekarenona in ubikinola. Iz slike 27 je razvidno, da ima ubidekarenon absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 280 nm, kar ustreza valovni dolžini za vrednotenje ubidekarenona, predpisani v monografiji. Absorpcijski maksimum ubikinola pa je pri 290 nm, kar smo uporabili kot drugo valovno dolžino za vrednotenje vzorcev. Posneli smo še raztopini standardov α -tokoferola in α -tokoferil acetata in ugotovili, da ima α -tokoferol boljši odziv pri 290 nm, α -tokoferil acetata pa pri 280 nm in ju tako tudi vrednotili.



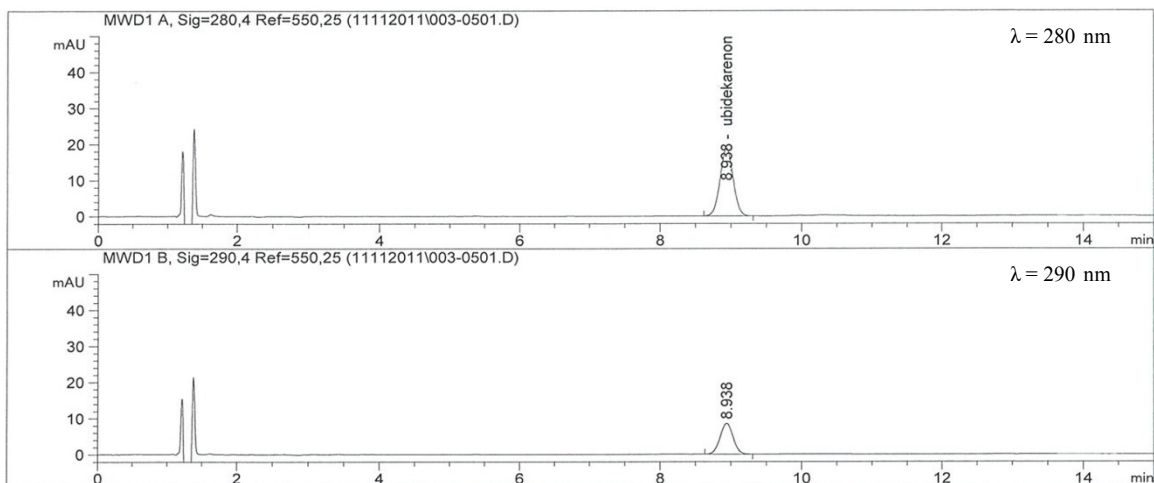
Slika 27: Absorpcijski spektri ubidekarenona, ubikinola, α -tokoferola in α -tokoferil acetata.

Ker sta vrhova in α -tokoferola in α -tokoferil acetata opazna že v kromatogramih vzorcev za določanje ubidekarenona, smo za njuno določanje uporabili kar isto metodo. Metode nismo posebej validirali, saj smo predvidevali, da se njuna vsebnost v kapsulah ne spreminja in da ne vplivata na sam ubidekarenon, kar smo tekom dela tudi potrdili.

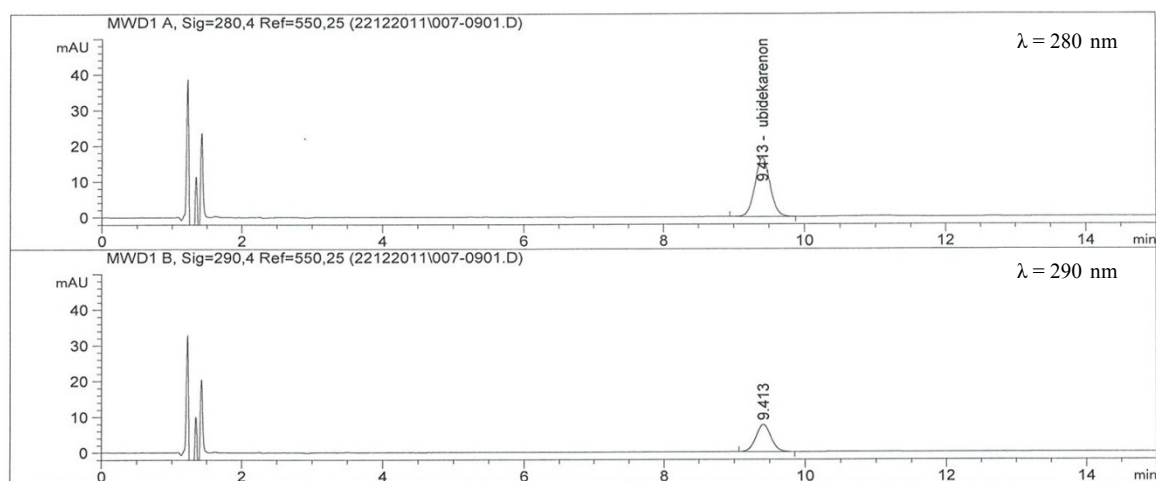
5.3 Kromatogrami vzorcev

5.3.1 Vzorec 1

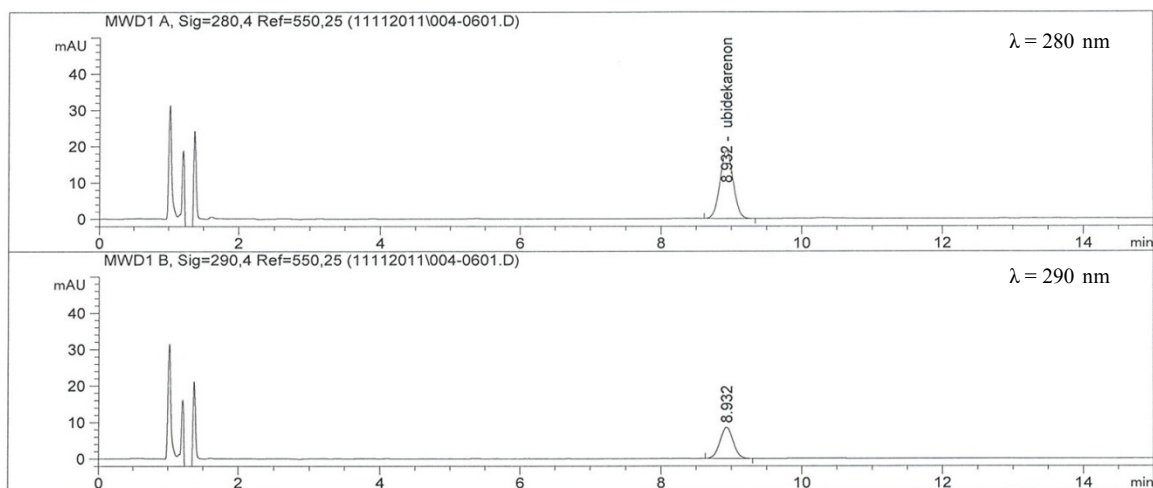
Vzorec 1 vsebuje le koencim Q₁₀ brez ostalih dodanih antioksidantov. Iz slik 28-31 in preglednice VII je razvidno, da se vsebnost ubidekarenona tekom umetnega staranja v stabilnostni komori ne spremeni niti pri najostrejših pogojih (40 °C, RV 75 %).



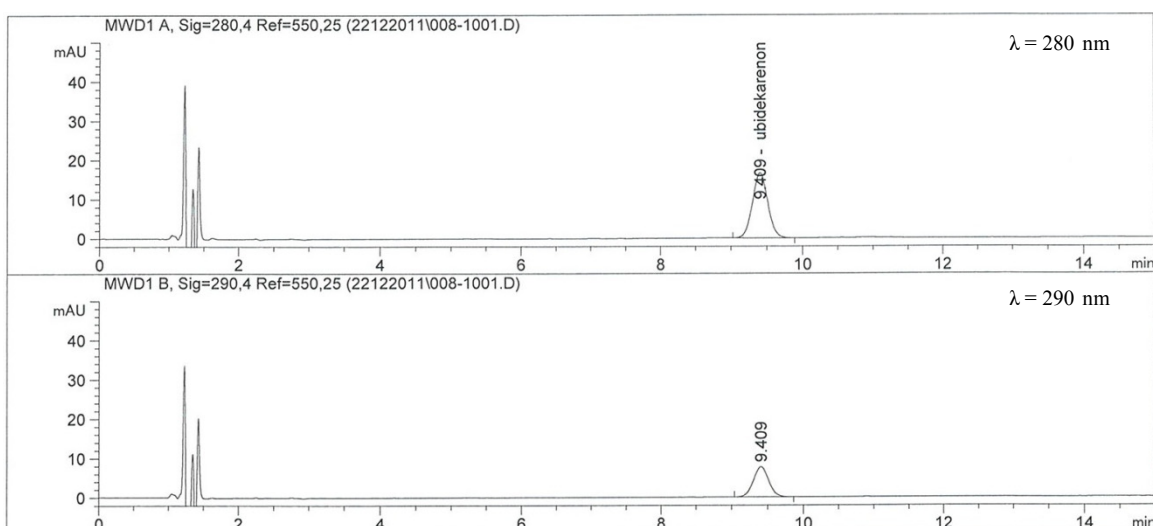
Slika 28: Kromatogram začetnega stanja kapsul **vzorca 1** preden smo jih dali v klimatsko komoro. Priprava vzorca brez dodatka FeCl₃.



Slika 29: Kromatogram končnega stanja kapsul **vzorca 1** po šestih tednih v klimatski komori pri 40 °C in RV 75 %. Priprava vzorca brez dodatka FeCl₃.



Slika 30: Kromatogram začetnega stanja kapsul **vzorca 1** preden smo jih dali v klimatsko komoro. Priprava vzorca z dodatkom FeCl_3 .

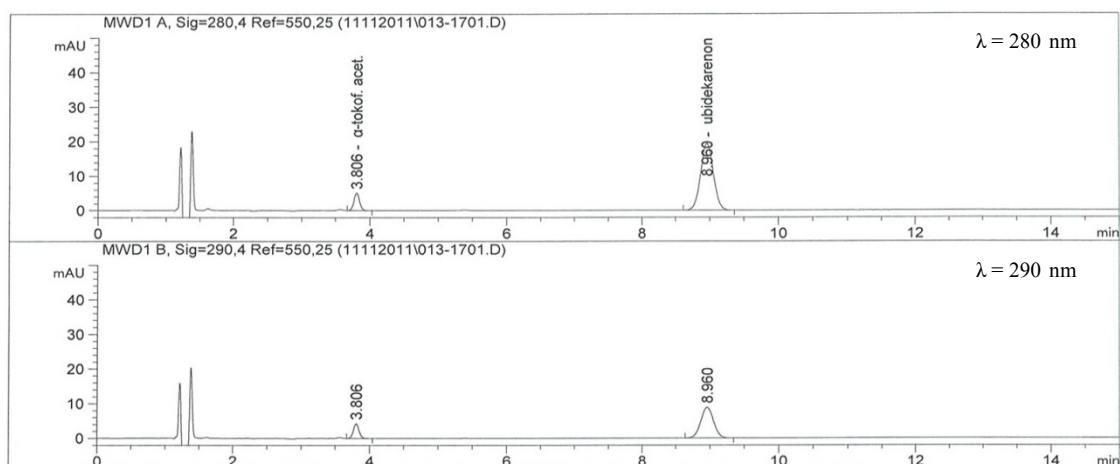


Slika 31: Kromatogram končnega stanja kapsul **vzorca 1** po šestih tednih v klimatski komori pri $40\text{ }^\circ\text{C}$ in RV 75 %. Priprava vzorca z dodatkom FeCl_3 .

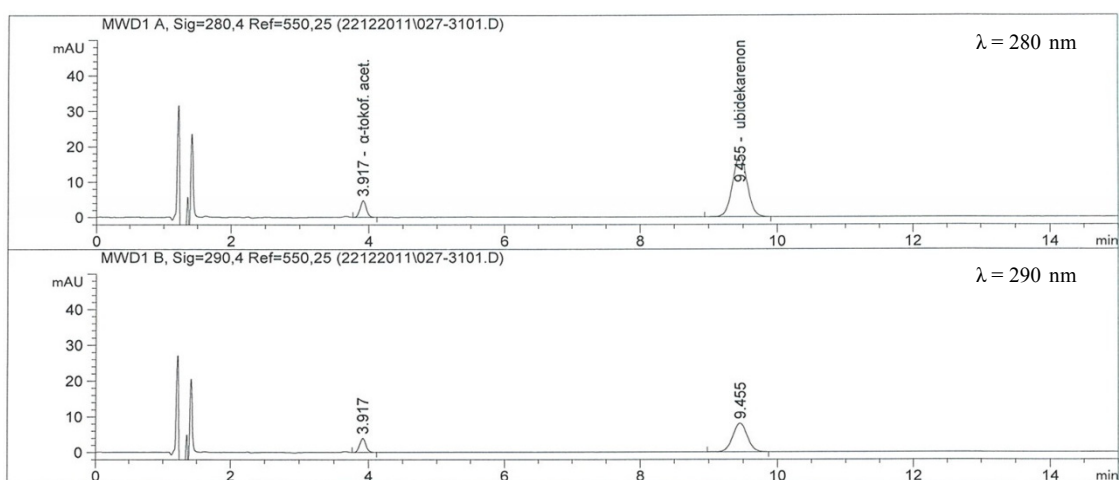
5.3.2 Vzorec 2

Vzorec 2 vsebuje koencim Q_{10} ter α -tokoferil acetat in selen (vsebnosti selena nismo vrednotili) kot dodatna antioksidanta. Predvidevali smo, da prisotnost α -tokoferil acetata v kapsulah ne vpliva na stabilnost kinonske oblike koencima Q_{10} , kar smo tekom preizkusa tudi potrdili. Slike 32-35 in preglednica VIII nam prikazujejo konstantno vsebnost

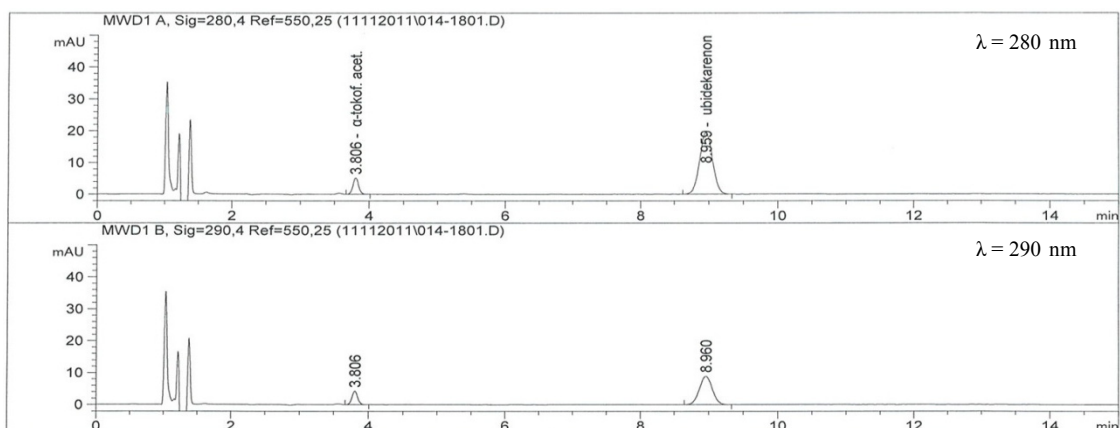
ubidekarenona in α -tokoferil acetata tekem umetnega staranja v klimatski komori (40 °C, RV 75%).



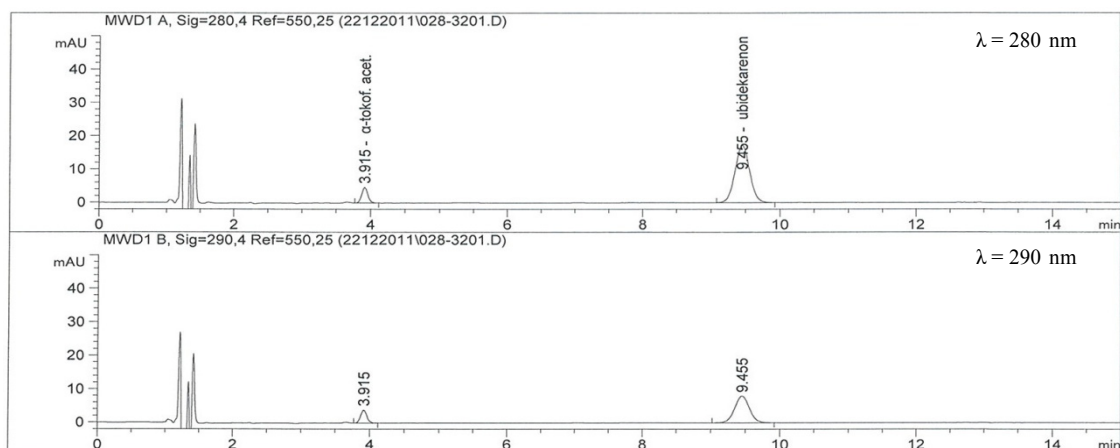
Slika 32: Kromatogram začetnega stanja kapsul **vzorca 2** preden smo jih dali v klimatsko komoro. Priprava vzorca brez dodatka FeCl_3 .



Slika 33: Kromatogram končnega stanja kapsul **vzorca 2** po šestih tednih v klimatski komori pri 40 °C in RV 75 %. Priprava vzorca brez dodatka FeCl_3 .



Slika 34: Kromatogram začetnega stanja kapsul **vzorca 2** preden smo jih dali v klimatsko komoro. Priprava vzorca z dodatkom FeCl_3 .



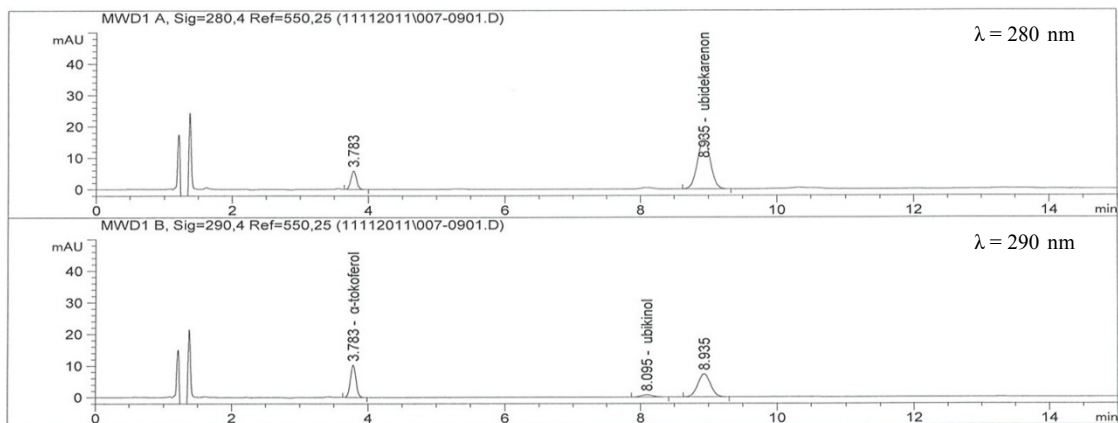
Slika 35: Kromatogram končnega stanja kapsul **vzorca 2** po šestih tednih v klimatski komori pri $40\text{ }^\circ\text{C}$ in RV 75% . Priprava vzorca z dodatkom FeCl_3 .

5.3.3 Vzorec 3

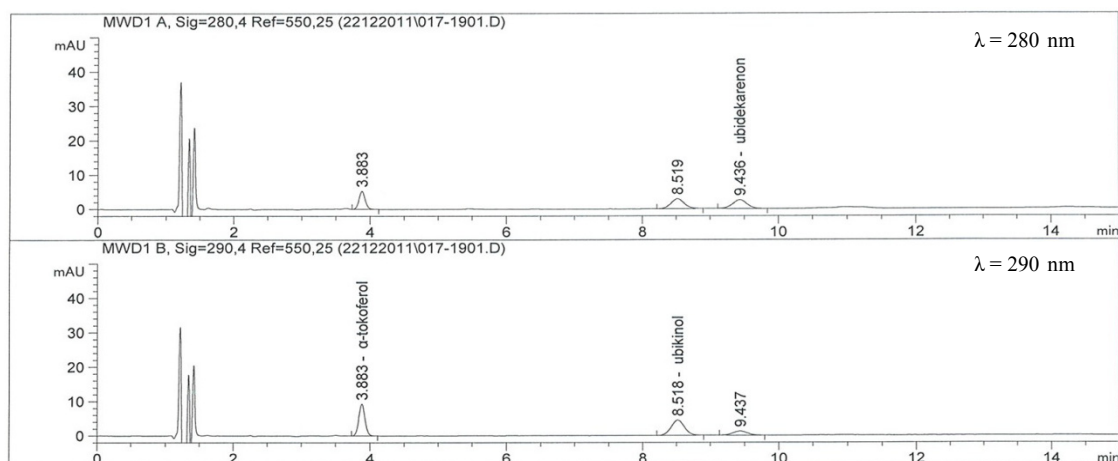
Vzorec 3 vsebuje koencim Q_{10} ter α -tokoferol, selen (vsebnosti selena nismo vrednotili) in askorbinsko kislino kot dodatne antioksidante. Že pri **vzorcu 2** smo dokazali da, prisotnost α -tokoferil acetata v kapsulah ne vpliva na stabilnost kinonske oblike koencima Q_{10} . Enako smo v **vzorcu 3** potrdili za α -tokoferol.

Rezultati meritev **vzorca 3** so potrdili našo hipotezo, da askorbinska kislina v mehkih želatinastih kapsulah reducira kinonsko obliko koencima Q_{10} v kinolno. Ker je sama

askorbinska kislina v oljni fazi, v kateri je raztopljen ubidekarenon, netopna (oz. zelo slabo topna), redukcija poteka kot medfazna reakcija postopoma in v odvisnosti od pogojev staranja. Na slikah 36 in 37, ki prikazujeta vzorca brez dodatka FeCl_3 , ter iz podatkov preglednice IX, vidimo da vsebnost ubidekarenona tekom umetnega staranja (40 °C, RV 75 %) pada, medtem ko se vsebnost ubikinola povečuje.

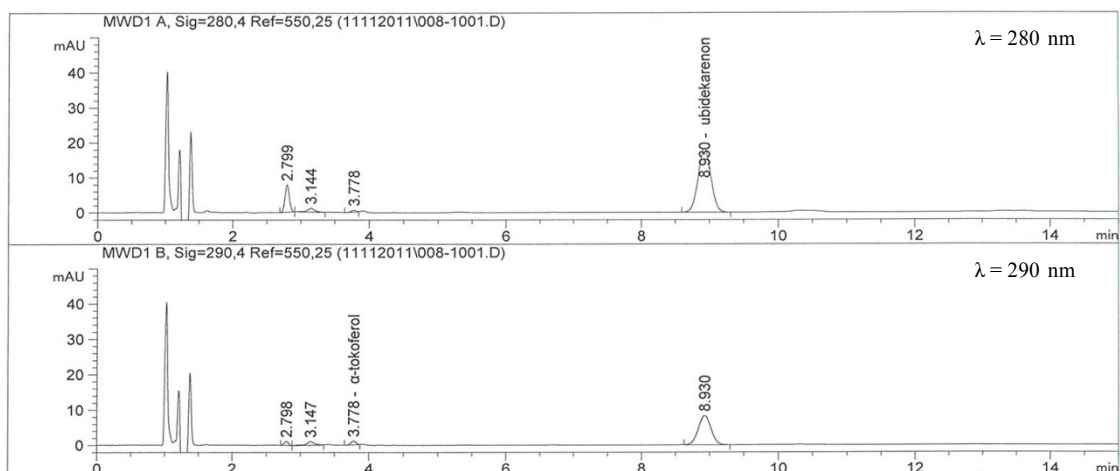


Slika 36: Kromatogram začetnega stanja kapsul **vzorca 3** preden smo jih dali v klimatsko komoro. Priprava vzorca brez dodatka FeCl_3 .

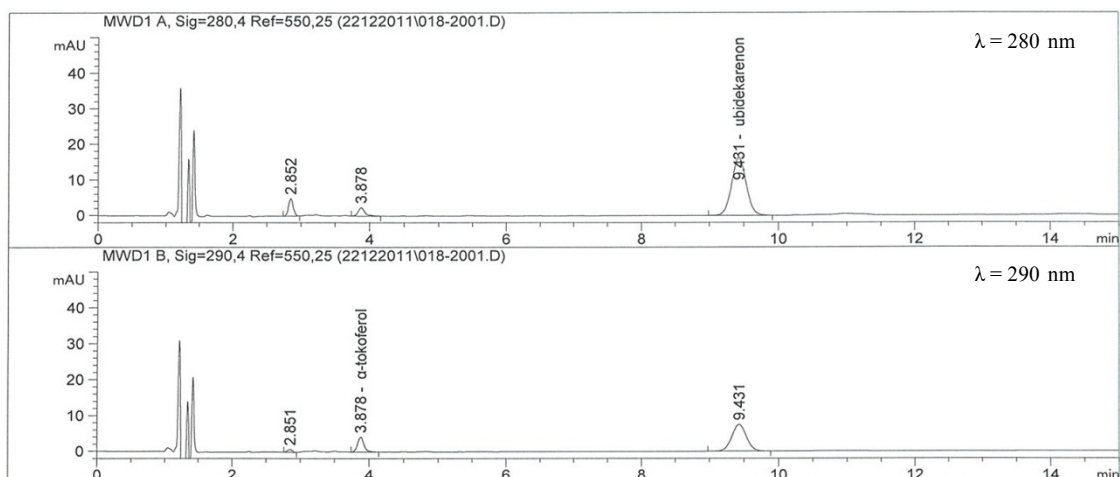


Slika 37: Kromatogram končnega stanja kapsul **vzorca 3** po šestih tednih v klimatski komori pri 40 °C in RV 75 %. Priprava vzorca brez dodatka FeCl_3 .

V primeru priprave vzorcev z dodatkom FeCl_3 (sliki 38 in 39 in preglednica IX) pretvorbe ubikinona v ubikinol ne zaznamo, ker FeCl_3 reducira prisoten ubikinol v vzorcu nazaj v kinon. Tako ne zaznamo spremembe v vsebnosti ubidekarenona tekom umetnega staranja v stabilnostni komori niti pri najostrejših pogojih (40 °C, RV 75 %).



Slika 38: Kromatogram začetnega stanja kapsul **vzorca 3** preden smo jih dali v klimatsko komoro. Priprava vzorca z dodatkom FeCl_3 .

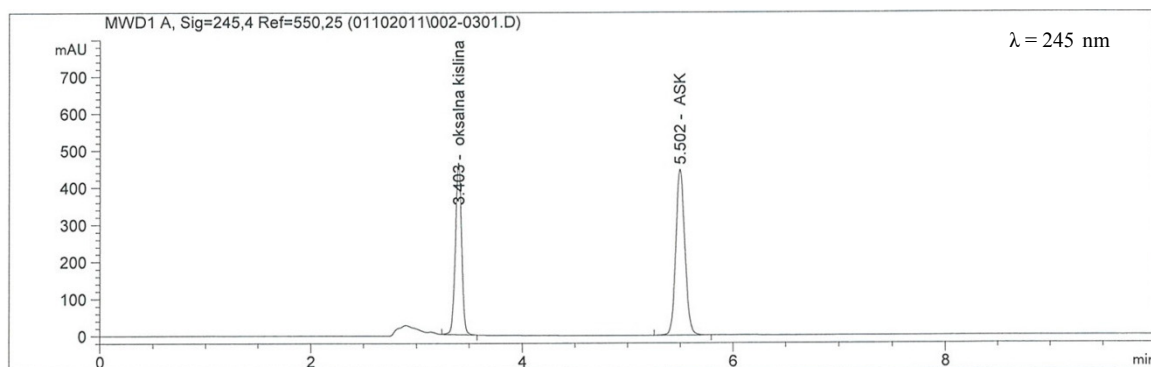


Slika 39: Kromatogram končnega stanja kapsul **vzorca 4** po šestih tednih v klimatski komori pri 40 °C in RV 75 %. Priprava vzorca z dodatkom FeCl_3 .

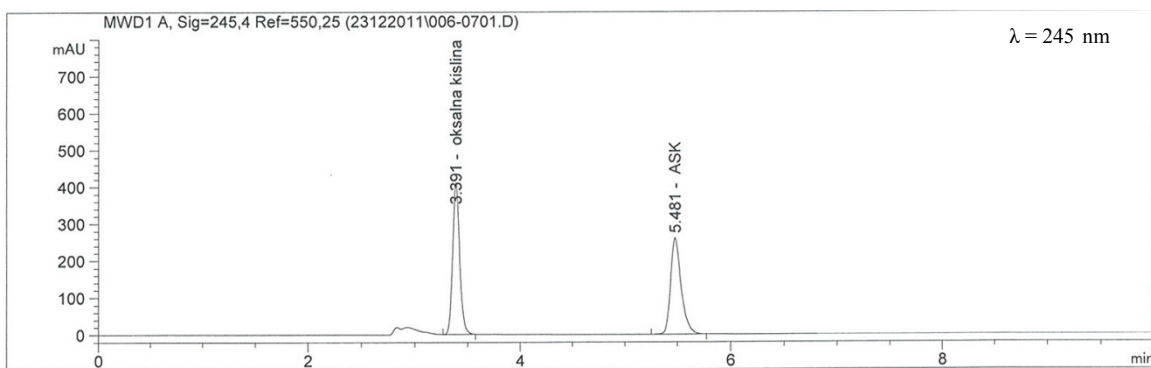
Primerjava slik 38 in 39 s slikama 36 in 37 nam kaže, da dodatek FeCl_3 vpliva tudi na α -tokoferol, saj se njegov vrh pri cca. 3,8 min. občutno zmanjša, hkrati pa se pojavita dva

nova vrhova pri cca. 2,8 min. in 3,1 min. Ta dva vrhova najverjetneje pripadata produktoma oksidacije α -tokoferola s FeCl_3 . Sama reakcija med α -tokoferolom in FeCl_3 je sicer znana, za naše delo pa ni bistvena in se ji nismo posebej posvečali (42).

Medtem ko se ubidekarenon reducira v ubikinol, se hkrati askorbinska kislina oksidira v dehidroaskorbinsko kislino. Iz slik 40 in 41 ter preglednice IX je razviden upad vsebnosti askorbinske kisline tekom procesa staranja, ki je največji pri najostrejših pogojih.



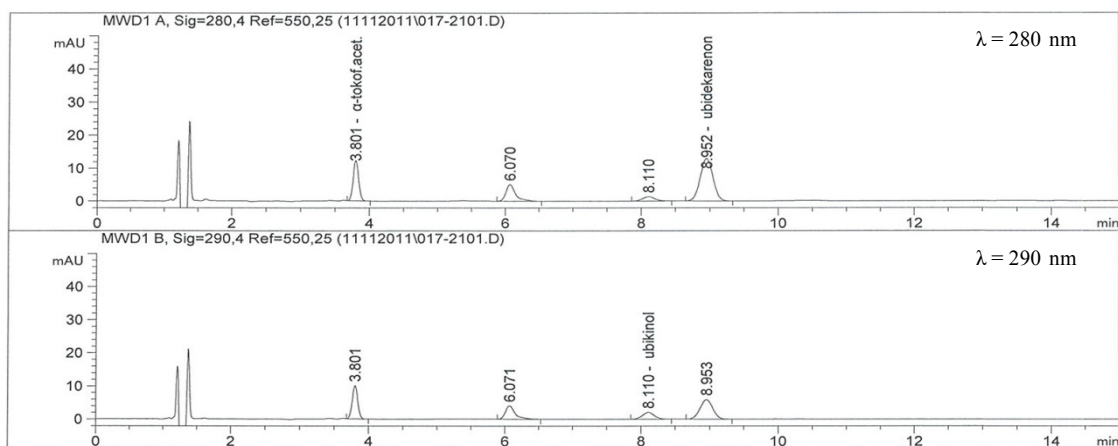
Slika 40: Kromatogram za določanje vsebnosti ASK začetnega stanja kapsul **vzorca 3** preden smo jih dali v klimatsko komoro.



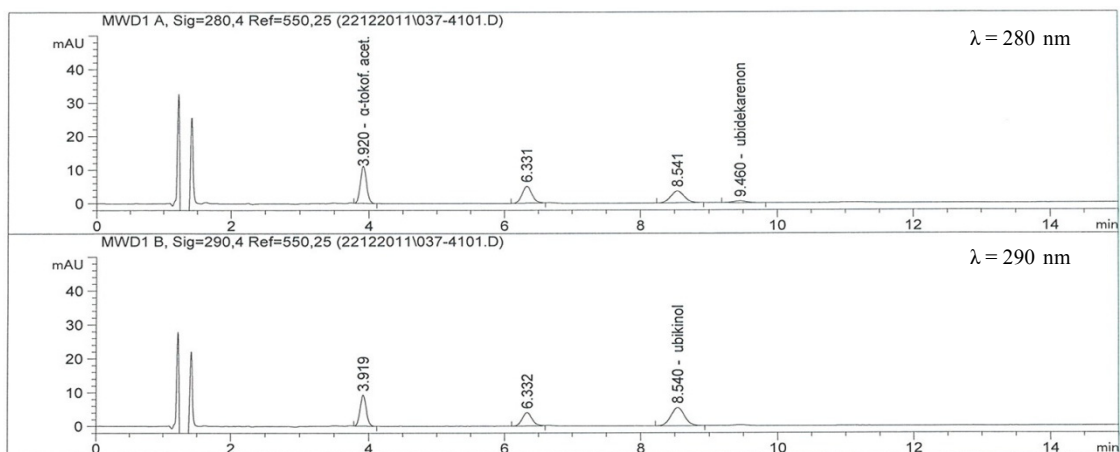
Slika 41: Kromatogram za določanje vsebnosti ASK končnega stanja kapsul **vzorca 3** po šestih tednih v klimatski komori pri $40 \text{ }^\circ\text{C}$ in RV 75 %.

5.3.4 Vzorec 4

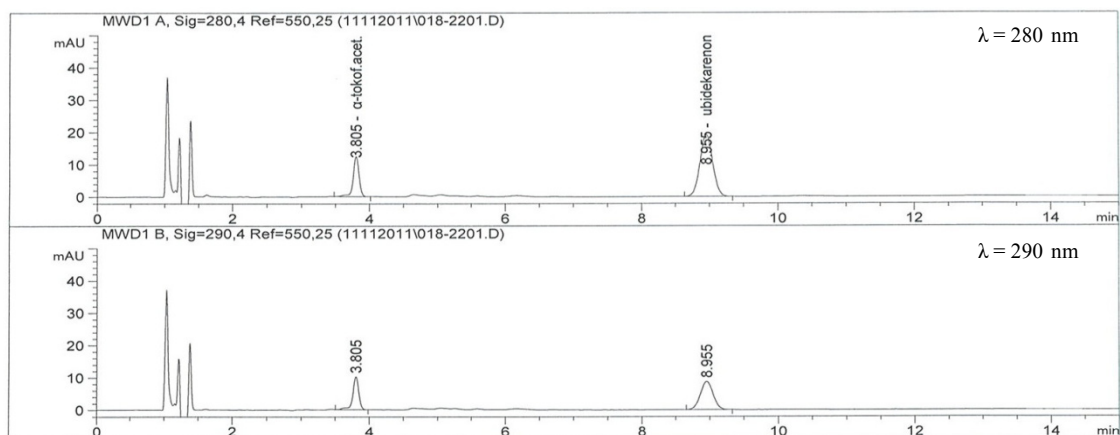
Vzorec 4 vsebuje koencim Q₁₀ ter α -tokoferil acetat, selen, β -karoten (vsebnosti selena in β -karotena nismo vrednotili) in askorbinsko kislino kot dodatne antioksidante. Že pri **vzorcih 2 in 3** smo dokazali, da prisotnost α -tokoferil acetata oz. α -tokoferola v kapsulah ne vpliva na stabilnost kinonske oblike koencima Q₁₀. Da askorbinska kislina kinonsko obliko koencima Q₁₀ pretvarja v kinolno obliko, medtem ko sama prehaja v dehidroaskorbinsko kislino, pa smo dokazali z **vzorcem 3**. Vse te predpostavke smo še dodatno potrdili z analizo **vzorca 4** (slike 42 do 47 in preglednica X), ki je že na samem začetku vrednotenja imel nekoliko višjo vsebnost reducirane oblike koencima Q₁₀ (slika 42, preglednica X). Verjetno je ta posledica starejše izdelave kapsul **vzorca 4** v primerjavi s kapsulami **vzorca 3**, na kar nakazuje njihov krajši rok uporabe.



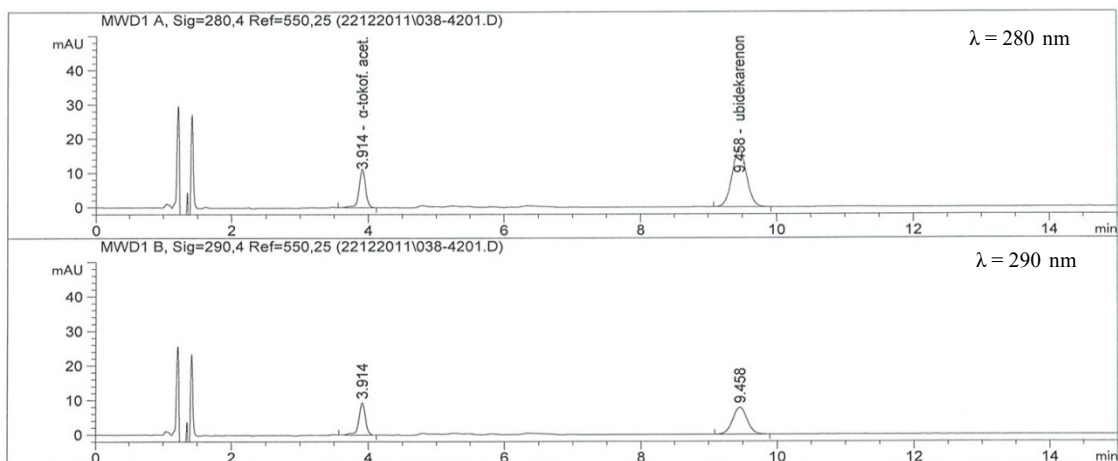
Slika 42: Kromatogram začetnega stanja kapsul **vzorca 4** preden smo jih dali v klimatsko komoro. Priprava vzorca brez dodatka FeCl₃.



Slika 43: Kromatogram končnega stanja kapsul **vzorca 4** po šestih tednih v klimatski komori pri 40 °C in RV 75 %. Priprava vzorca brez dodatka FeCl₃.

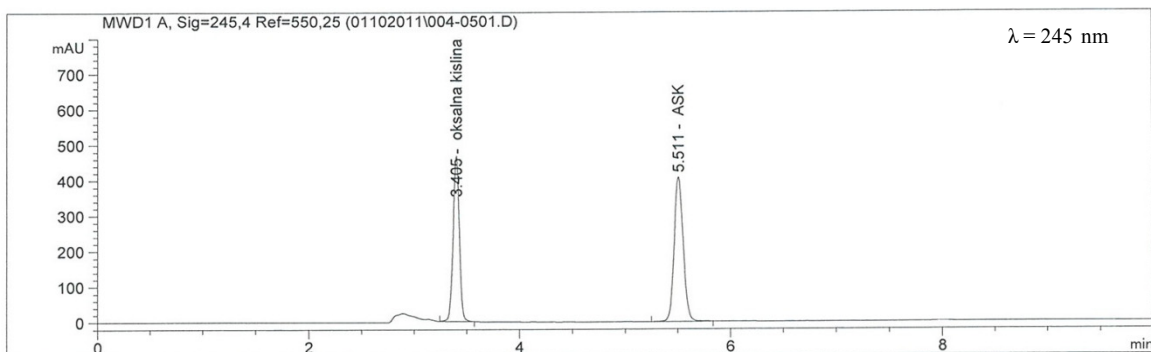


Slika 44: Kromatogram začetnega stanja kapsul **vzorca 4** preden smo jih dali v klimatsko komoro. Priprava vzorca z dodatkom FeCl₃.

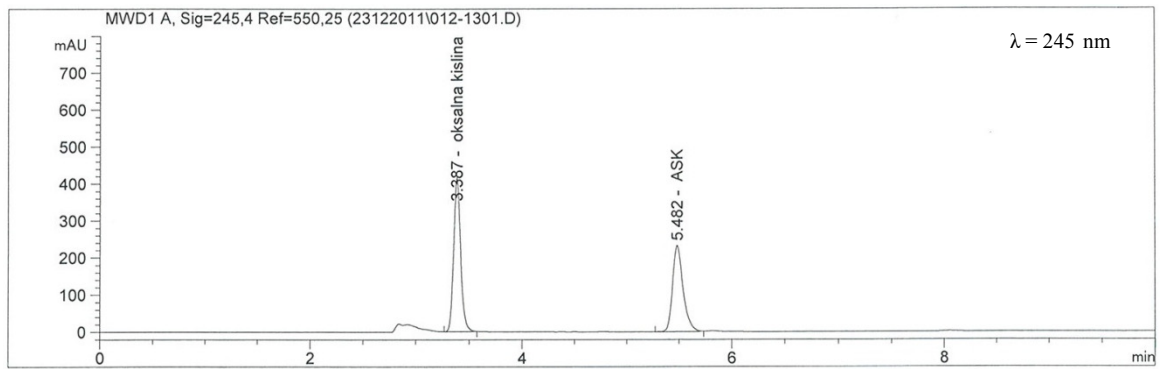


Slika 45: Kromatogram končnega stanja kapsul **vzorca 4** po šestih tednih v klimatski komori pri 40 °C in RV 75 %. Priprava vzorca z dodatkom FeCl_3 .

Na slikah 42 in 43 je vidno, da je v vzorcu 4 prisoten dodaten vrh pri cca. 6,2 min., ki po dodatku FeCl_3 izgine (sliki 44 in 45). Verjetno gre za β -karoten, vendar tega nismo potrdili, ker nismo imeli na voljo ustreznega standarda. Na vrh α -tokoferil acetata dodatek FeCl_3 tako kot pri **vzorcu 2** ne vpliva (spojina nima proste fenolne OH skupine, zato ni podvržena oksidaciji).



Slika 46: Kromatogram za določanje vsebnosti ASK začetnega stanja kapsul **vzorca 4** preden smo jih dali v klimatsko komoro.



Slika 47: Kromatogram za določanje vsebnosti ASK končnega stanja kapsul **vzorca 4** po šestih tednih v klimatski komori pri 40 °C in RV 75 % .

6. SKLEP

Metoda, ki smo jo uporabili za določanje askorbinske kisline v mehkih želatinastih kapsulah, se je izkazala za ustrezno, saj smo potrdili, da nam daje ustrezno ponovljivost in točnost rezultatov ter da je v našem delovnem območju koncentracij odziv linearen.

Z vrednotenjem vzorcev mehkih želatinastih kapsul koencima Q₁₀, ki so bili šest tednov izpostavljeni različnim pogojem (temperaturi in relativni vlagi), predpisanim v ICH smernici Q1A(R2), ki se navezuje na testiranje stabilnosti učinkovin in farmacevtskih izdelkov, smo prišli do naslednjih zaključkov:

- V **vzorcu 1**, ki je vseboval le koencim Q₁₀, skozi celotno časovno obdobje spremljanja ni prišlo do bistvenih sprememb v vsebnosti ubidekarena, torej je le-ta pod preučevanimi pogoji stabilen.
- V **vzorcu 2**, ki je vseboval koencim Q₁₀ in α -tokoferil acetat, prav tako nismo zaznali večjih sprememb v vsebnosti ubidekarena. Njegova vsebnost je sicer nekoliko nihala, kar lahko pripišemo slabši enakomernosti vsebnosti v kapsulah. Hkratna prisotnost ubidekarena in α -tokoferil acetata v mehkih želatinastih kapsulah ne vpliva na njuno stabilnost.
- V **vzorcih 3 in 4**, ki sta poleg koencima Q₁₀ in vitamina E vsebovala tudi askorbinsko kislino, je potekala redukcija kinonske oblike Q₁₀ v kinolno: koncentracija slednje je s časom naraščala, medtem ko se je koncentracija ubidekarena zniževala. Vzporedno je padala tudi vsebnost askorbinske kisline. Hitrost reakcije je bila odvisna od pogojev, v katerih smo shranjevali vzorce. Pričakovano je bila najhitrejša pri najvišji temperaturi in zračni vlagi (40 °C in RV 75 %). Celokupna koncentracija koencima Q₁₀, ki smo jo določili z dodatkom FeCl₃ med postopkom priprave vzorca, je bila konstantna. Vsebnosti α -tokoferola in α -tokoferil acetata se nista spreminjali.

Rezultati nam potrjujejo, da ubidekarenon in askorbinska kislina v mehkih želatinastih kapsulah medsebojno reagirata, zato je takšna kombinacija s stališča kakovosti zdravil nesprejemljiva. S stališča varnosti pa po drugi strani najbrž ne predstavlja nevarnosti za pacienta, saj sta v organizmu reducirana in oksidirana oblika koencima Q₁₀ v ravnotežju in imata enak terapevtski učinek.

Metoda za določanje ubidekarena v kapsulah po ameriški farmakopeji (USP) ni primerna za vrednotenje farmacevtskih oblik, kjer se pojavljajo kombinacije različnih antioksidantov. Dodatek raztopine FeCl₃, med pripravo vzorca oksidira ves morebitni

nastali kinol nazaj v kinonsko obliko, s čimer se prikrije kemijska nestabilnost ubidekarenona v takšni formulaciji in neustrezna kakovost izdelka.

7. LITERATURA

- (1) S. Sen, R. Chakraborty: The Role of Antioksidant in Human Health; American Chemical Society: Washington, DC 2001: 1-37
- (2) <http://sl.wikipedia.org/wiki/Antioksidant>, dostopano 16.03.2012
- (3) A. Pedrih, S. Pečar: Katalitični antioksidanti kot nove zdravilne učinkovine; Farm. Vestn 2006; 57: 24-29
- (4) [http://sl.wikipedia.org/wiki/Radikal_\(kemija\)](http://sl.wikipedia.org/wiki/Radikal_(kemija)), dostopano 19.03.2012
- (5) B. Rejc, J. Osredkar, J. Geršak: Oksidacijski stres in nosečnost; Farm. Vestn 2012; 63:153-161
- (6) V. Humar Gupta, S. Kumar Sharma: Plants as natural antioksidants; Natural Product Radiance 2006; Vol. 5(4): 326-334
- (7) Editors: Luiz Trugo and Paul M. Finglas: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2nd Ed.) Tocopherols/ Properties and Determination, Psysiology; Elsevier Science 2003: 5789-5799
- (8) F.Shahidi, Y. Zhong: Antioxidants: Regulatory status; Bailey's Industrial Oil and Fat Products Sixth Edition, Six Volume Set. 2005: 491-509
- (9) <http://en.wikipedia.org/wiki/Tocopherol>, dostopano 17.08.2011
- (10) http://sl.wikipedia.org/wiki/Vitamin_E, dostopano 17.08.2011
- (11) www.zdravilnerastline.si/vitamini-in-minerali/40-vitamin-e-tokoferol.html, dostopano 17.09.2012
- (12) E. T. Denisov, I.B. Afanas'ev: Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology; Taylor & Franis Group 2005: 835-892.
- (13) C. K. Sen, S. Khanna, S. Roy: Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols; Life Sciences 2006; 78: 2088-2098
- (14) C. K. Sen, S. Khanna, C. Rink, S. Roy: Tocotrienols: The emerging face of natural vitamin E, Viatamins and Hormones; Elsevier Inc. 2007; Volume 76: 203-261
- (15) Editors: Luiz Trugo and Paul M. Finglas: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2nd Ed.) Ascorbic acid/ Properties and Determination, Psysiology; Elsevier Science 2003: 316-331
- (16) http://sl.wikipedia.org/wiki/Ascorbic_acid, dostopano 21.09.2011
- (17) http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_C, dostopano 29.09.2012

- (18) <http://www.zdravilnerastline.si/vitamini-in-minerali/44-vitamin-c-askorbinska-kislina.html>
- (19) J.M. May: Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?; FASEB J. 1999; Vol. 13: 995-1006
- (20) <http://www.farmatid.no/id/4002.0>
- (21) J. Žmitek, K. Žmitek: Koencim Q₁₀ kot prehransko dopolnilo in zdravilo; Farm. Vestn 2009; 60: 150-157
- (22) R. Pavlin: Koencim Q10 – Klinična raba; Zdrav Var 2008; 77: 159-162
- (23) R. Pandel Mikuš, B. Poljšak: Funkcionalna hranila v zdravi prehrani; Obzor Zdr N 2005; 39: 201-207
- (24) M. Evans, J. Baisley, S. Barss, N. Guthrie: A randomized, double-blind trial on the bioavailability of two CoQ10 formulations; Journal of Functional Foods 1 2009: 65-73
- (25) R. Boyer: Temelji biokemije (druga izdaja); Študentska založba 2005: 450-465
- (26) <http://sl.wikipedia.org/wiki/Ubikinon>, dostopano 01.10.2012
- (27) <http://altmed.creighton.edu/Parkinsons/cq10.htm>, dostopano 01.10.2012
- (28) M. Turunen, J. Olsson, G. Dallner: Metabolism and function of coenzyme Q; Biochimica et Biophysical Acta 2004; Vol. 1660: 171-199
- (29) A. Galinier, A. Carrière, Y. Fernandez and other: Biological validation of coenzyme Q redox state by HPLC-EC measurement: relationship between coenzyme Q redox state and coenzyme Q content in rat tissues; FEBS Letters 2004: 53-57
- (30) Lippincott W. & W.: Remington: The Science and Practice of Pharmacy: Stability of pharmaceutical products, Philadelphia, cop. 2006: 1025-1034
- (31) http://www.cedrugstorenews.com/userapp//lessons/page_view_ui.cfm?lessonuid=&pageid=989BCF7C17641E89D90DE1257196BC1D, dostopano 10.10.2012
- (32) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability Testing of New Drug Substances and Products: Text and Methodology Q1A (R2), februar 2003
- (33) Statistične metode in merilna negotovost, zbornik predavanj, Ljubljana, 5. Februar 1998-01-28; Zavod za tehnično izobraževanje, 1998
- (34) L. Huber: Validation of Analytical Methods; Informa Healthchare, New York, USA, 2007

- (35) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), november 2005
- (36) S. Razpotnik: Določanje vsebnosti ubidekarenona v mehkih kapsulah z metodo HPLC; Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2011
- (37) Ubidecarenone Capsules. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 35-NF 30). Vol 1. Rockville, MD: UnitedStates Pharmacopeia Convention; 2011:1461-1462.
- (38) Morten A. Kall, C. Andersen: Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples; Journal of Chromathography B 1999; 730: 101-111
- (39) T. Volk, M. Bogataj, R. Roškar, V. Kmetec, A. Mrhar: Determination of main low molecular weight antioxidants in urinary bladder wall using HPLC with electrochemical detector; International Juornal of Pharmaceutics 2005; 291: 161-169
- (40) Lunetta S, Roman M. Determination of coenzyme Q10 content in raw materials and dietary supplements by high-performance liquid chromatography-UV: collaborative study. J AOAC Int. 2008 Nov-Dec; 91(6): 702-708.
- (41) WO2008111440: Method for stable storage of reduced coenzyme Q10.
- (42) K Mukai, S Itoh and H Morimoto. Stopped-flow kinetic study of vitamin E regeneration reaction with biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K, and tocopherolquinone) in solution. J. Biol. Chem. 1992; 267: 22277-22281.