

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»**

*На правах рукописи*

**Петрова Екатерина Викторовна**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЭНЗИМА Q<sub>10</sub> В ПРОДУКЦИИ  
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ И КОСМЕТИЧЕСКОЙ  
ПРОМЫШЛЕННОСТИ МЕТОДОМ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ**

02.00.02 – аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

**Научный руководитель:**

Доктор химических наук,

доцент

Короткова Елена Ивановна

Томск-2015

## СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ.....	2
УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	11
1.1. История открытия и изучения коэнзимов.....	11
1.2. Биохимические функции коэнзима Q <sub>10</sub> .....	12
1.2.1. Участие в переносе электронов дыхательной цепи митохондрий.....	12
1.2.2. Антиоксидантная функция коэнзима Q <sub>10</sub> .....	14
1.3. Физико-химические свойства коэнзимов Q.....	14
1.4. Методы пробоподготовки коэнзима Q <sub>10</sub> .....	21
1.4.1. Первичная.....	22
1.4.2. Осаждение белков и гидролиз.....	23
1.4.3. Процесс экстракции.....	24
1.4.4. Восстановление экстрагированных форм.....	27
1.5. Методы определения коэнзима Q <sub>10</sub> .....	27
1.5.1. Спектрофотометрические методы.....	27
1.5.2. Хроматографические методы со спектрофотометрическим и электрохимическим детектированием.....	29
1.5.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием.....	32
1.5.4. Электрохимические методы.....	34
1.6. Методы определения антиоксидантов и антиоксидантной активности объектов.....	37
1.6.1. Хемилюминесцентные методы определения антиоксидантов.....	38
1.6.2. Кинетические методы определения антиоксидантов.....	40
1.6.3. Спектроскопические методы анализа антиоксидантной активности.....	42
1.6.4. Электрохимические методы исследования антиоксидантной активности.....	44
1.6.4.1. Кулонометрическое определение интегральной антиоксидантной емкости объектов.....	45
1.6.4.2. Потенциометрический метод определения антиоксидантной активности.....	46
1.6.4.3. Амперометрические и потенциометрические методы определения антиоксидантной активности.....	47
1.6.5. Методы, основанные на взаимодействии антиоксидантов с кислородом и его активными радикалами.....	49
1.7. Постановка задачи.....	52
ГЛАВА 2. АППАРАТУРА И МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА.....	53
2.1. Приборы, ячейки, электроды, реактивы и растворы.....	53
2.2. Объекты исследования.....	56
2.3. Методика эксперимента.....	60

2.4. Статистическая обработка результатов.....	62
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ - ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОЭНЗИМА Q <sub>10</sub> НА СТЕКЛОУГЛЕРОДНОМ ЭЛЕКТРОДЕ.....	65
3.1. Влияние различных факторов на аналитический сигнал коэнзима Q <sub>10</sub> .....	65
3.1.1. Влияние материала индикаторного электрода на аналитический сигнал коэнзима Q <sub>10</sub> .....	66
3.1.2. Влияние природы фонового электролита на аналитический сигнал коэнзима Q <sub>10</sub> .....	67
3.1.3. Влияние pH фонового электролита на аналитический сигнал коэнзима Q <sub>10</sub> .....	69
3.1.4. Влияние параметров электролиза (время и потенциал электролиза) и скорости развертки потенциала на аналитический сигнал коэнзима Q <sub>10</sub> .....	71
3.2. Исследование физико-химических закономерностей протекания реакции окисления-восстановления коэнзима Q <sub>10</sub> на стеклоуглеродном электроде.....	74
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ КОЭНЗИМА Q <sub>10</sub> ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ.....	78
ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ НА АНАЛИТИЧЕСКИЙ СИГНАЛ КОЭНЗИМА Q <sub>10</sub> .....	81
5.1. Влияние витамина С на аналитический сигнал коэнзима Q <sub>10</sub> .....	81
5.2. Влияние витамина В1 на аналитический сигнал коэнзима Q <sub>10</sub> .....	84
5.3. Влияние гиалуроновой кислоты на аналитический сигнал коэнзима Q <sub>10</sub> .....	86
ГЛАВА 6. МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЭНЗИМА Q <sub>10</sub> В ПРОДУКЦИИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ И КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ.....	89
6.1. Разработка вольтамперометрической методики определения содержания коэнзима Q <sub>10</sub> в фармацевтической и косметической промышленности.....	89
6.1.1. Методика выполнения измерений количественного содержания коэнзима Q <sub>10</sub> в фармацевтических и косметических объектах.....	93
6.1.2. Подготовка вольтамперометрической методики определения коэнзима Q <sub>10</sub> к метрологической аттестации.....	96

6.2. Определение содержания коэнзима Q <sub>10</sub> в БАД и косметических объектах методами вольтамперометрии и спектрофотометрии. Сравнительный анализ.....	97
6.2.1. Определение содержания коэнзима Q <sub>10</sub> в косметических препаратах.....	100
6.2.2. Определение содержания коэнзима Q <sub>10</sub> в БАД.....	100
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ.....	102
ВЫВОДЫ.....	107
Список литературы.....	108
Приложение 1.....	125

## УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

CoQ<sub>10</sub> – коэнзим Q<sub>10</sub>

БАД – биологически активные добавки

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

АТФ – аденозинтрифосфат

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

ВНТ – 2,6-ди-трет-бутил-4-метил-фенол (ионол)

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ТФЭ – твердофазовая экстракция

СУЭ – стеклоуглеродный электрод

ХСЭ – хлорсеребряный электрод

РПЭ – ртутно-пленочный электрод

ПОО – перекисное окисление липидов

АО – антиоксиданты

АОА – антиоксидантная активность

АБАП – 2,2'-АЗО-БИС(2-АМИДИНОПРОПАНА)

АИБН – азобисизобутиронитрил

ХЛ - хемиллюминисценция

КХА – количественный химический анализ

СКО – среднеквадратичное отклонение

ПОЛ – перекисное окисление липидов

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Коэнзим Q<sub>10</sub> является важным компонентом окислительно-восстановительной цепи митохондрий, а также единственным жирорастворимым антиоксидантом, синтезируемым в организме человека. Коэнзим Q<sub>10</sub> играет важную роль в генерации клеточной энергии, усиливает иммунную систему и защищает организм от действия свободных радикалов. Старение, плохое питание, стресс и инфекции имеют сильное негативное влияние на процесс выработки коэнзима Q<sub>10</sub> в организме [1]. После 35 лет уменьшается способность организма генерировать коэнзим Q<sub>10</sub> из продуктов питания и развивается его дефицит в организме. Все это приводит к потребности в дополнительном приеме коэнзима Q<sub>10</sub> в виде биологически активных добавок (БАД). По результатам многих клинических исследований показана положительная тенденция применения БАД на основе коэнзима Q<sub>10</sub> при различных заболеваниях сердечно-сосудистой системы, так же употребление препаратов на его основе способствуют лечению многих заболеваний: онкологические заболевания, жировая дистрофия печени, гепатиты, циррозы, болезнь Альцгеймера, сахарный диабет, рассеянный склероз и другие.

В настоящее время увеличиваются требования к качеству производимых биологически активных добавок, они должны соответствовать таким критериям как: качество, эффективность и безопасность. В России качественный и количественный состав производимых БАД строго регламентируется нормативными документами. Поэтому контроль за качеством БАД является актуальной задачей.

Коэнзим Q<sub>10</sub>, являясь эффективным антиоксидантом, широко используется в косметической промышленности. В составе косметических средств по уходу за кожей лица и тела коэнзим Q<sub>10</sub> восстанавливает упругость кожи, устраняет морщины, замедляет старение кожи. Поэтому

очень важно контролировать содержание коэнзима  $Q_{10}$  в косметических препаратах на всех стадиях их производства.

В настоящее время для идентификации и определения коэнзима  $Q_{10}$  в биологически активных добавках Европейская Фармакопея рекомендует использовать жидкостную хроматографию со спектрофотометрическим детектированием при 275 нм или спектрофотометрию [2]. Однако, электроаналитические методы, в частности вольтамперометрия, имея высокую чувствительность и простоту аппаратного оформления, могут быть использованы как альтернатива методам высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и спектрофотометрическим для определения коэнзима  $Q_{10}$ .

**Цель работы.** Разработать вольтамперометрический способ определения коэнзима  $Q_{10}$  для контроля его содержания в фармацевтических и косметических продуктах.

В соответствии с этим в работе поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать влияние различных факторов на электрохимический сигнал коэнзима  $Q_{10}$  (природа фонового электролита, pH раствора, материал электрода).

2. Изучить физико-химические закономерности протекания реакции окисления-восстановления коэнзима  $Q_{10}$  на поверхности электрода. Предложить механизм окисления - восстановления коэнзим  $Q_{10}$ .

3. Оценить влияние веществ различной природы на аналитический сигнал коэнзима  $Q_{10}$ .

4. Разработать вольтамперометрическую методику определения коэнзима  $Q_{10}$  и установить основные метрологические характеристики разработанной методики.

5. Провести сравнительное определение содержания коэнзима  $Q_{10}$  в фармацевтических и косметическим препаратах вольтамперометрическим и спектрофотометрическим методами.

### **Научная новизна.**

1. Впервые установлены физико – химические закономерности протекания реакции окисления - восстановления коэнзима  $Q_{10}$  на стеклоуглеродном электроде методом циклической вольтамперометрии. Предложены схемы протекания реакций окисления - восстановления коэнзима  $Q_{10}$  в водных нейтральных средах на стеклоуглеродном электроде.

2. Впервые изучено влияние ряда компонентов на ток электроокисления коэнзима  $Q_{10}$ . Показано, что в присутствии витамина С, витамина В1 и гиалуроновой кислоты ток электроокисления увеличивается. Предложены схемы взаимодействия коэнзима  $Q_{10}$  с изученными веществами.

3. Впервые исследована антиоксидантная активность коэнзима  $Q_{10}$  методом катодной вольтамперометрии с использованием процесса электровосстановления кислорода. Предложены схемы взаимодействия коэнзима  $Q_{10}$  с кислородом и его радикалами. Показано, что антиоксидантными свойствами обладает восстановленная форма коэнзима  $Q_{10}$ .

4. Разработан новый подход к определению коэнзима  $Q_{10}$  в продукции фармацевтической и косметической промышленности методом анодной постоянно-токовой вольтамперометрии, отличающийся высокой чувствительностью, простотой, экспрессностью и удобством анализа. Проведено сопоставление результатов анализа независимым спектрофотометрическим методом.

### **Практическая значимость.**

Разработана вольтамперометрическая методика определения коэнзима  $Q_{10}$  в продукциях фармацевтической и косметической промышленности. Установлены метрологические характеристики методики. Показано, что вольтамперометрическая методика более чувствительна и требует менее сложной пробоподготовки, позволяет исключить использование токсичных реагентов и сократить время анализа по сравнению со

спектрофотометрической методикой

Разработанная методика рекомендована к использованию в аналитических лабораториях фармацевтической и косметической промышленности для контроля содержания коэнзима  $Q_{10}$  в сырье и готовой продукции.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Результаты исследования влияния различных факторов на электрохимический сигнал коэнзима  $Q_{10}$  (природа фонового электролита, рН раствора, материал электрода).
2. Физико-химические закономерности протекания реакции окисления - восстановления коэнзима  $Q_{10}$  на стеклоуглеродном электроде.
3. Оценка влияния веществ различной природы (витамина С, гиалуроновой кислоты, витамина  $B_1$ ) на аналитический сигнал коэнзима  $Q_{10}$ .
4. Вольтамперометрическая методика определения коэнзима  $Q_{10}$  в продукции фармацевтической и косметической промышленности.
5. Результаты сравнительных испытаний определения содержания коэнзима  $Q_{10}$  в фармацевтических и косметических препаратах вольтамперометрическим и спектрофотометрическим методами.

#### **Степень достоверности и апробация результатов работы.**

Достоверность полученных данных обусловлена представительным объемом проведенных экспериментов, использованием современных аналитических методов и метрологической обработки результатов, которые хорошо согласуются с литературными данными и результатами, полученными референтным спектрофотометрическим методом.

Основные результаты работы были представлены на конференциях: «Новые методы аналитической химии: Первая зимняя молодежная школа-конференция с международным участием», Санкт-Петербург, 17 февраля - 22 марта 2013 «XVII Международный симпозиум имени академика М. А. Усова

студентов и молодых ученых», Томск, 1- 5 апреля 2013; «VII Всероссийской конференции молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием по химии и наноматериалам», Санкт-Петербург, 2 - 5 апреля 2013; «XIV Всероссийская научно-практическая конференция имени профессора Л.П. Кулёва студентов и молодых ученых с международным участием», Томск, 13 - 16 мая 2013; «Euroanalysis XVII: Analytical chemistry for human well-being and sustainable development», Warsaw, August 25 - 29, 2013; «Химия и химическая технология в XXI веке: XV Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва», Томск, 26 - 29 Мая 2014;

**Работа выполнена при финансовой поддержке грантов:**

1. Программа ФЦП, № 14.740.11.1369, (2011-2013), мероприятие 1.1. Тема госконтракта – «Разработка высокочувствительных методик определения и исследование биологически активных веществ с антиоксидантными свойствами в объектах природного и искусственного происхождения с целью совершенствования профилактики и лечения социально-значимых заболеваний» (Руководитель ассистент каф ФАХ ИПР Воронова О.А.).

2. Программа ФЦП, 14.В37.21.0811, (2012-2013), мероприятие 1.2.1. Тема соглашения – «Создание теоретических основ, высокочувствительных методик и сенсоров для электрохимических методов анализа биологически активных веществ» (Руководитель профессор каф ФАХ ИПР Короткова Е.И.)

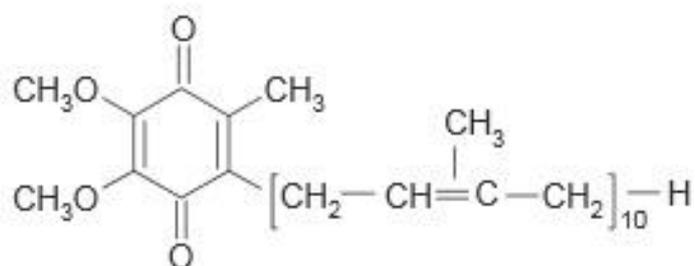
3. Программа ФЦП, 14.В37.21.1183, (2012-2013), мероприятие 1.3.1. Тема соглашения – «Сравнительные исследования антиоксидантной активности природных объектов физико-химическими методами анализа» (Руководитель ассистент каф ФАХ ИПР Дорожко Е.В.)

## 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. История открытия и изучения коэнзимов

В 1955 году ученые из лаборатории Мортон (Ливерпуль, Англия) впервые из кишечной слизистой оболочки лошади выделили неомыляемый липид со специфичным спектром поглощения в области 272 нм. Новое вещество идентифицировали как хинон и обнаружено, что оно широко распространено в тканях животных. Мортон назвал это вещество убихинон («*ubiquitous quinon*» – «вездесущий хинон»). Два года спустя в лаборатории Дэвида Грина (Висконсин, США) Крэйн обнаружил коэнзим Q<sub>10</sub> в липидном экстракте митохондрий и назвали его коэнзим Q<sub>10</sub> из-за его участия в электронной транспортной цепи митохондрий [1].

Год спустя Вольф под руководством профессора Фолкерса установил точную структурную формулу коэнзима Q<sub>10</sub> (рис. 1.1). Позднее лаборатория Фолкерса стала центром для очистки и синтеза большого количества пищевых добавок, помимо коэнзима Q<sub>10</sub>, также витамина B<sub>6</sub>, пантотеновой кислоты, биотина, витамина B<sub>12</sub> и мевалоновой кислоты [3].



**Рисунок 1.1.** Структурная формула коэнзима Q<sub>10</sub>

В 1963 году профессор Ямамура из Японии первый применил коэнзим Q<sub>10</sub> при лечении людей с сердечной недостаточностью. Меллорс и Тэйпель в 1966 году показали, что восстановленная форма коэнзима Q<sub>10</sub> является сильным антиоксидантом. Технология промышленного производства коэнзима Q<sub>10</sub> была разработана в Японии в 1970-ом году, с тех пор началось его массовое производство в количествах достаточных, для проведения

исследований по возможности применения коэнзима в клинической практике [4].

В 1978 британского биохимика Питера Митчела удостоили Нобелевской премией за открытие хемоосмотического механизма синтеза АТФ. Он предположил, что цепь реакций, осуществляющихся в процессе дыхания, представляет собой последовательность сменяющих друг друга носителей водорода и электронов. Митчел доказал, что одним из главных переносчиков электронов в процессе дыхания выступает коэнзим  $Q_{10}$  [5].

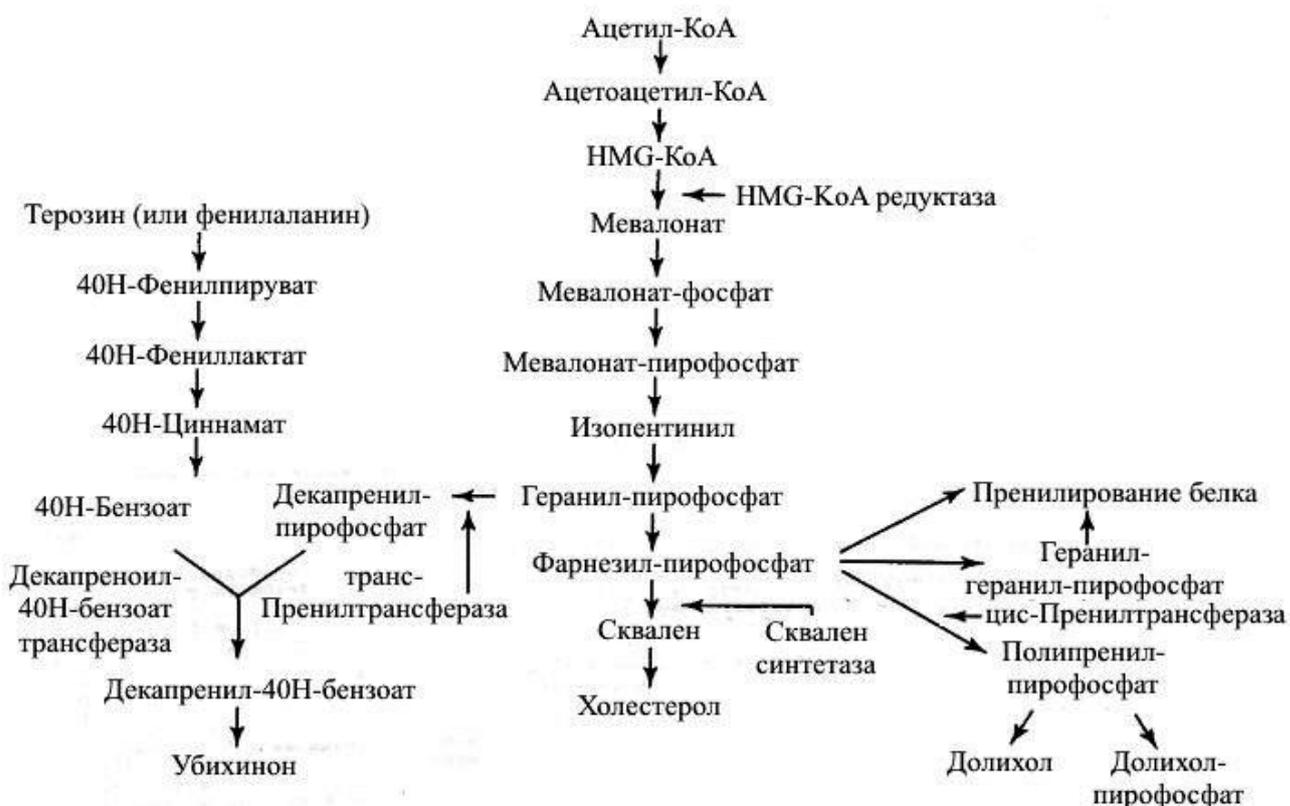
## **1.2. Биохимические функции коэнзима $Q_{10}$**

Благодаря своим окислительно-восстановительным свойствам и растворимости (растворяется в липидах) коэнзим  $Q_{10}$  выполняет в клетках организма множество различных функций.

### **1.2.1. Участие в переносе электронов дыхательной цепи митохондрий.**

В клетках коэнзим  $Q_{10}$  локализуется в середине фосфолипидного бислоя различных мембран, хотя, относительное содержание варьируется в различных органеллах. Коэнзим  $Q_{10}$  находится в мембранах таких органелл клетки, как эндоплазматическая сеть, аппарат Гольджи, пероксисом, везикул и в большей степени в мембранах митохондрий в каждой клетке человеческого тела [6]. Высокие концентрации коэнзима сосредоточены в клетках органов с высоким энергетическим обменом, таких как сердце, печень, мускулы и селезенка.

Биосинтез коэнзима  $Q_{10}$  из аминокислоты тирозин происходит в 17 шагов (рис. 1.2), вовлекая в процесс восемь витаминов (рибофлавин, пиридоксин, никотинамид, аскорбиновая кислота, кобаламин, фолиевая кислота, токоферол, пантотеновая кислота) и некоторые рассеянные элементы [7].



**Рисунок 1.2.** Биосинтез убихинона из тирозина.

Из-за сложности процесса биосинтеза, недостаток некоторых ферментов или регулятивных белков может быть причиной недостатка коэнзима  $Q_{10}$  в детском или подростковом возрасте [8].

Коэнзим  $Q_{10}$  является коферментом по меньшей мере для трех митохондриальных ферментов (комплексы I, II и III), так же как ферменты в других частях клетки [9].

Митохондриальные ферменты пути ферментативного окисления необходимы для формирования высокоэнергетических фосфатов – аденозинтрифосфата (АТФ), от действия которого зависят все клеточные функции. Процесс переноса электронов и протонов хиноновым кольцом имеет фундаментальное значения для все форм жизни: убихинон в митохондриях животных, пластохинон в хлоропластах растений, менахинон в бактериях [10].

### 1.2.2. Антиоксидантная функция коэнзима Q<sub>10</sub>

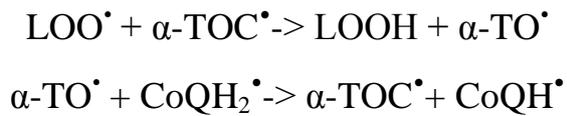
Коэнзим Q<sub>10</sub> единственный жирорастворимый антиоксидант синтезируемый организмом человека. Он присутствует во всех клеточных мембранах и превосходит как в количестве, так и эффективности другие антиоксиданты, присутствующие в организме. Благодаря своим биохимическим функциям и способности растворяться в липидах коэнзим Q<sub>10</sub> находится во всех органеллах клетки, защищая их от действия свободных радикалов и как следствие оксидативного стресса [11].

Антиоксидантная функция восстановленной формы коэнзима Q<sub>10</sub> – гидрохинона (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) на порядок выше невосстановленной. Убихинол является мощным липофильным антиоксидантом, который выступает как ловушка для свободных радикалов. Коэнзим Q<sub>10</sub> обеспечивает стабильность клеточных мембран, защищает ДНК от воздействия свободных радикалов, индуцирующих окислительные повреждения и способен к регенерации и восстановлению других антиоксидантов как токоферол и аскорбиновая кислота. Другой важной функцией коэнзима Q<sub>10</sub> является передача клеточных сигналов и экспрессия генов.

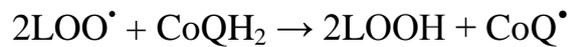
Прямое доказательство антиоксидантной активности коэнзима Q<sub>10</sub> было показано на дрожжах. Дрожжи, испытывающие дефицит коэнзима Q<sub>10</sub> генерируют больше пероксидных радикалов жирных кислот, чем обычные дрожжи. Другим прямым доказательством антиоксидантной функции коэнзима Q<sub>10</sub> является положительный эффект при применении кремов на основе коэнзима Q<sub>10</sub> людьми пожилого возраста. Исчезает сигнал люминисценции генерируемый свободными радикалами при анализе крема, содержащего коэнзим Q<sub>10</sub> [2].

Совместно с  $\alpha$ -токоферолом убихинол защищает внутренние мембраны митохондрий от процессов перекисного окисления, действуя как антиоксиданты. Убихинол способен восстанавливать токоферол-радикалы,

образующиеся при взаимодействии токоферола с липидными пероксид-радикалами или кислородными радикалами до токоферола:



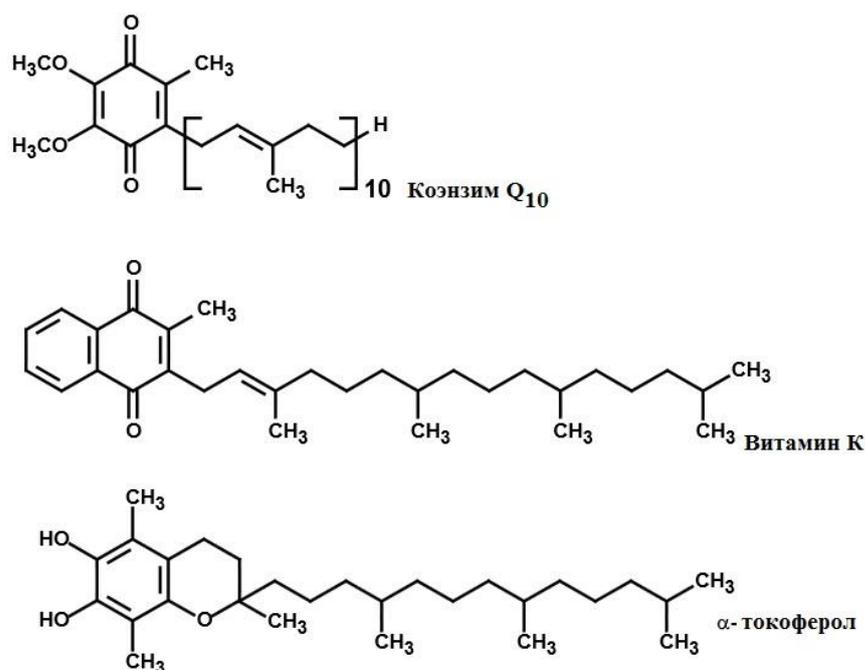
Без участия коэнзима  $\text{Q}_{10}$  восстановление токоферол-радикалов в организме идет очень медленно. Наибольшая регенерация токоферол-радикалов в клетках происходит в липопротеинах низкой плотности, где содержится наибольшее количество убихинола [12]. Также как и токоферол коэнзим  $\text{Q}_{10}$  в организме способен взаимодействовать с липидными радикалами по схеме:



Однако, с возрастом содержание коэнзима  $\text{Q}_{10}$  в организме уменьшается, а следовательно, и уменьшается способность организма противостоять действию свободных радикалов, все это приводит к потребности приема коэнзима  $\text{Q}_{10}$  в виде пищевых добавок.

### 1.3. Физико-химические свойства коэнзимов Q

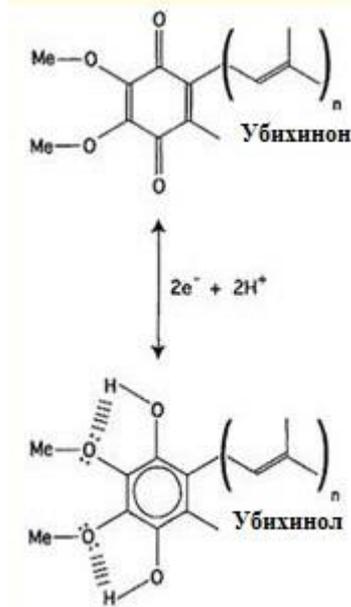
По химической структуре коэнзим  $\text{Q}_{10}$  представляет собой 2,3-диметокси-5-метил-6-полиизопрופן пара-бензохинон, изопреновая цепь находится в шестом положении (рис. 1.1). В зависимости от количества звеньев в боковой изопреновой цепи коэнзимы могут обозначаться по-разному. В организме человека и млекопитающих содержится убихинон с десятью изопреновыми звеньями. По своему строению молекула коэнзима  $\text{Q}_{10}$  схожа с витамином К и витамином Е (рис. 1.3).



**Рисунок 1.3.** Структура молекул коэнзима Q<sub>10</sub>, Витамина К и α-токоферола.

Коэнзим Q<sub>10</sub> представляет собой желто-оранжевые кристаллы без вкуса и запаха. Молекулярная масса 863 г/моль. Молекула коэнзима является очень неустойчивой и при температуре около 49°C начинает разрушаться. Температура плавления 49-51°C. Как убихинон, так и убихинол хорошо растворимы в обычных липидных растворителях: ацетоне, диэтиловом эфире, хлороформе, этаноле, петролейном эфире - которые и используются для экстракции коэнзима Q<sub>10</sub> из мембран. Коэффициенты распределения хинолов в системе циклогексан/вода обычно ниже, чем для хинонов, поскольку появляются два доступных для формирования водородных связей протонов. При этом метокси-группы в положениях 2 и 3 у коэнзима Q<sub>10</sub> в достаточной степени выравнивают эти коэффициенты, так как образуется внутримолекулярная водородная связь (рис.1.4), и протон гидроксильной группы становится гораздо менее доступным для образования внешних водородных связей. Коэффициенты распределения в системе октанол/вода для хинонов и хинолов также схожи, поскольку водородные связи с октанолом образуются в равной степени для обеих редокс-форм. Таким

образом, окисленная и восстановленная формы коэнзима Q<sub>10</sub> будут, в грубом приближении, одинаково распределяться в мембранном бислое: как в его центре, схожем по гидрофобности с циклогексаном, так и ближе к поверхности, схожей с октанолом [9].



**Рисунок. 1.4.** Коэнзим Q<sub>10</sub> и его редокс-формы (убихинон/убихинол)

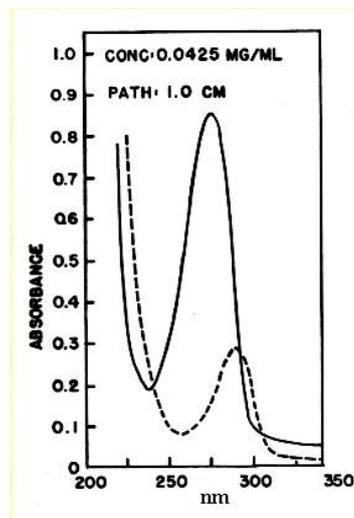
Помимо двух основных наиболее стабильных форм, коэнзим Q<sub>10</sub> имеет еще и другие короткоживущие нестабильные протонированные и окисленные формы, участвующие в процессах последовательного одноэлектронного переноса электронов в клетке (рис. 1.5)



же, в свою очередь, присоединением двух протонов превращается в убихинол. В данном случае в ходе восстановления убихинона происходит последовательное присоединение сразу двух электронов, тогда как при окислении убихинола перенос электронов разделен акцептированием протонов.

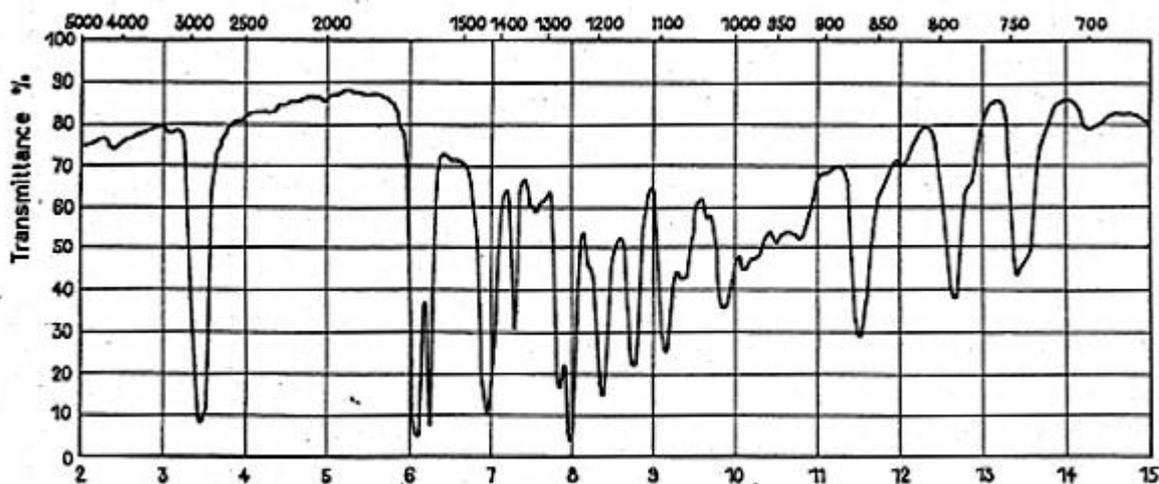
Содержание коэнзима  $Q_{10}$  в митохондриях различных тканей неодинаково (1-4.5 нмоль коэнзима  $Q_{10}$  на мг белка (у грызунов)). Так больше всего коэнзима  $Q_{10}$  на мг белка приходится на клетки сердечной и скелетных мышц, а на клетки мозга и печени приходится всего 1 нмоль коэнзима  $Q_{10}$  на мг белка. Коэнзим  $Q_{10}$  свободно перемещается в билипидном слое внутренней мембраны. Изопреноидный хвост располагается в центре бислоя параллельно поверхности, удерживая молекулу внутри мембраны. Бензохиноновое кольцо также погружено в мембрану, но способно менять свою пространственную ориентацию, тем самым, обеспечивая перенос электронов: кольцо может располагаться как в середине бислоя параллельно поверхности, так и вдоль ацильных цепей перпендикулярно поверхности, но не ближе 1-2 нм к поверхности. Таким образом,  $CoQ$  не взаимодействует с растворенными в матриксе восстановителями типа глутатиона и аскорбата.

Все убихиноны имеют специфический спектр поглощения в ультрафиолетовой области с характерным максимумом при 275 нм (рис. 1.6).



**Рисунок. 1.6.** Спектр поглощения коэнзима  $Q_{10}$  (-) и коэнзима  $Q_9$  (- -)

Инфракрасные спектры для всех соединений этого ряда содержат практически одинаковые полосы, свойственные их общему ядру (рис. 1.7)



**Рисунок. 1.7.** Инфракрасный спектр поглощения  $\text{CoQ}_{10}$

Расшифровка полос ИК спектра приведена на рисунке 1.8.

**Расшифровка ИК спектра поглощения коэнзима  $\text{Q}_{10}$  ( $\text{C}_{60}\text{H}_{10}$ )**

---

$\text{cm}^{-1}$	
1669	<b>C=C</b> растягивающие колебания в боковой цепи по двойным связям (видимое только в гидрохиноне)
1653	<b>C=O</b> растягивающие колебания в хиноне
1608	возможные колебания связи <b>C = C</b> в хинонном кольце
1259	возможно валентные колебания связи <b>Ag - O</b>
1205	} <b>O—CH<sub>2</sub></b> валентные колебания
1149	
1095	
872	
793	} колебания кристаллических связей в транс положении
746	

---

**Рисунок. 1.8.** Расшифровка полос поглощения ИК спектра молекулы коэнзима  $\text{Q}_{10}$

Обе формы - убихинон и убихинол (рис. 1.9) свободно перемещаются в липидной фазе мембран митохондрий, перенося электроны с НАДН-дегидрогеназы на цитохром b.



он становится неустойчив и подвергается трансформации. Его расположение во внутренней мембране митохондрий обеспечивает интенсивную изоляцию от воздействия биологических систем. Все эти свойства делают количественное определение коэнзима  $Q_{10}$  сложной аналитической задачей. Прикладные аналитические методы включают в себя, как правило, несколько шагов: осаждение белков, выделение соединения, очистку полученного экстракта с одновременной защитой от химических превращений. Ключевой аналитический инструмент, используемый для его определения это высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с различными детекторами. Для проведения полного анализа на содержание коэнзима  $Q_{10}$  в образцах плазмы или сыворотки крови International Coenzyme  $Q_{10}$  Association рекомендует метод ВЭЖХ с УФ-детектированием при 275 нм [13].

#### **1.4.1. Подготовка**

Определению коэнзима  $Q_{10}$  в таких образцах как твердая пища или ткани должен предшествовать процесс тщательной гомогенизации. Как правило, для этого используются образцы массой 0,5 – 1 г [14]. Так как анализ коэнзима в биологических материалах затруднен его нестабильностью, некоторые авторы рекомендуют снижать температуру пробоподготовки образцов, для того чтобы снизить скорость разложения коэнзима  $Q_{10}$ . Как правило, температуры 4-5<sup>0</sup>С достаточно для измельчения образцов тканей [15, 16], однако, некоторые авторы рекомендуют погружать образцы в жидкий азот [16-18]. Чтобы избежать разложения аналита под действием света, процесс гомогенизации, а так же последующая пробоподготовка должны выполняться при тусклом свете [19, 20]. Растворители как вода [15,21], холодный физиологический раствор [22], 2-Пропанол [14], смесь метанола и гексана [22] или метанол-хлороформа [23], использовали для обеспечения оптимальной консистенции гомогенизата. Некоторые авторы также рекомендуют использовать буфер Трис, содержащий сахарозу или фосфатный буфер, содержащий ЭДТА [24]. Добавление неионных

поверхностно-активных веществ (ПАВ) использовали для лучшего растворения анализируемого вещества. Так как коэнзим  $Q_{10}$  очень сильно подвергается окислению, образцы должны быть защищены против нежелательного воздействия кислорода в процессе пробоподготовки. Для этих целей в раствор добавляются антиоксиданты, такие как 2,6-дитрет-бутил-4-метилфенол (ВНТ) или боргидрид натрия [22,25].

#### **1.4.2. Осаждение белков и гидролиз**

Следующий этап подготовки образцов включает в себя депротеинизацию гомогенизатов или жидкостей, таких как сыворотка или плазма. Жидкостная хроматография является основным методом, используемым для количественного определения убихинона. Однако, белки, обнаруживаемые в пробах, оказывают негативное влияние на хроматографическую колонку, что может привести к полному подавлению сигнала на хроматограмме. В работах [14,26] для осаждения белков из образцов сыворотки крови крыс использовали 2-Пропанол. 1-Пропанол использовали в качестве депротеинизирующего агента при определении коэнзима  $Q_{10}$  в сыворотке [27] и плазме крови людей [28,29]. Вследствие своей доступности и низкой токсичности, этанол является наиболее часто используемым агентом для белка. Например, он его использовали, для осаждения белков из человеческой крови в работах [20, 25, 27, 31, 32], а так же из гомогената ткани [15, 16, 21, 22, 33, 34]. Некоторые другие исследователи в качестве агента рекомендуют применять метанол для первичной обработки образцов крови [35, 36] и тканей [17, 23, 37]. Кроме того, для первичной подготовки образцов для определения количества коэнзима  $Q_{10}$  в пищевых продуктах использовали смесь метанола и этанола (1:1) [38]. Коммуру и соавторы [39] использовали 10%-ый раствор трихлоруксусной кислоты в качестве депротеинизирующего агента при определении коэнзима  $Q_{10}$  в плазме крови [40].

Лишь небольшое количество методов используют щелочное омыление, для удаления большого количества соединений, которые сопровождают коэнзим  $Q_{10}$  в биологическом материале. Однако, некоторые авторы советуют избегать омыления поскольку оно является основным источником аналитической ошибки [41]. Если данный процесс важен, то необходимо учесть, что щелочной гидролиз вызывает значительное разрушение  $Q_{10}$ . Чтобы устранить данную проблему обычно используют спиртовые растворы КОН и NaOH [30, 42, 43, 44]. Этанол не может быть использован как растворитель для щелочей, в щелочной среде он реагирует с коэнзимом  $Q_{10}$ , образуя некоторые этоксиальные искажения [45]. Для защиты аналита от дополнительных химических разрушений рекомендуют использовать пирогаллол [30, 43, 44] или аскорбиновую кислоту.

### 1.4.3. Процесс экстракции

После завершения процесса депротеинизации супернатанты всё еще слишком сложны и полны нежелательных компонентов, которые могут мешать окончательному определению. Изоляция коэнзима  $Q_{10}$  от гомогенатных тканей или жидкостей организма обычно выполняли с использованием классической жидкостно-жидкостной экстракции. Этот шаг имеет решающее значение в процессе пробоподготовки. В связи с указанным выше, растворители, используемые в процедуре должны обеспечить селективное растворение заданного анализируемого вещества и гарантии максимальной эффективности его экстракции. *N*-Гексан применяли для извлечения коэнзима  $Q_{10}$  из плазмы крови человека [25, 27, 32, 46], пищевых добавок [47], диетических образцов *Eskimo* [38] и пищевых проб [42, 48, 49]. 2-Пропанол использовали в качестве экстрагента для выделения коэнзима  $Q_{10}$  из образцов продуктов питания [14]. Аналогичный растворитель использовали для выделения коэнзима  $Q_{10}$  из сыворотки крови крыс [26]. Выделение коэнзима  $Q_{10}$  из проб образцов пищевой промышленности проводили с использованием смеси этанол:гексан (1:5) [50]. Смесь

петролейный эфир:этилацетат:метанол (1:1:1) применяли для выделения коэнзима Q<sub>10</sub> из мультивитаминных БАД [51]. *N*-Пропанол рекомендуется организацией International CoQ<sub>10</sub> Association как депротеинезитаор и экстракционный агент для выделения CoQ<sub>10</sub> из плазмы крови [28].

Процесс экстракции может сопровождаться дополнительными, нежелательными химическими реакциями. Для защиты анализа от окисления и обеспечения стабильности использовали антиоксидант ВНТ. 2-Тетрагидрофуран использовали в качестве стабилизатора [47] при исследовании всасывания коэнзима Q<sub>10</sub> через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ). Добавление раствора хлорида натрия [24, 42] использовали для предотвращения формирования эмульсии.

Твердофазовая экстракция (ТФЭ) успешно применяется для выделения и очистки коэнзима Q<sub>10</sub>. Последующее очищение в присутствии силикагеля и твердофазной экстракционной колонке C18 предложили для замены растворителя и очищения экстракта [52]. Каплан и соавторы [53] предложили введение ТФЭ в процесс определения коэнзима Q<sub>10</sub> в плазме крови. Они использовали 2-пропанол в процессе элюирования. Родригез-Акуна и соавторы [54] предложили использовать твердофазовую экстракционную колонку C18 для приготовления образцов растительного масла. Для этих целей гептановый раствор образцов пропускали через экстракционную колонку и затем анализ элюировали смесью гептан:диэтиловый эфир в пропорции 80:20(v/v).

Процедуру ТФЭ - CO<sub>2</sub> использовали как альтернативу классической жидкостно-жидкостной экстракции. Так, при ТФЭ - CO<sub>2</sub> не используют токсичных растворителей, что удовлетворяет всем принципам «зеленой технологии». Методику процесса ТФЭ - CO<sub>2</sub> разработали для выделения коэнзима Q<sub>10</sub> из сухих биомасс *Pseudomonasdiminuta* [55]. Процент выделения коэнзима Q<sub>10</sub> составлял 96,2 %. ТФЭ - CO<sub>2</sub> с применением метанола как модификатора использовали при определении коэнзима Q<sub>10</sub> и

менахинонов в активном иле [56]. Поточная сверхкритическая экстракция совместно с сверхкритической жидкостной хроматографией использовали при изучении редок статуса коэнзима  $Q_{10}$  в лиофилизате *R. Marinum*A-501 [57].

Основное условие процесса экстракции – выделяемый компонент должен быть свободен от всех компонентов, которые могут быть элюированы в то же время что и аналит, или могут прерывать хроматографический анализ. Присутствие жиров может быть причиной некоторых проблем, так как они растворяются в неполярных растворителях. Экстракцию растворителями выполняемую совместно с воздействием ультразвука применяли для выделения коэнзима  $Q_{10}$  из образцов, содержащих небольшое количество липидов, таких как фармацевтические препараты или продукты с низким содержанием жира [52,58].

Для определения коэнзима в пчелиной пыльце разработали методику, основанную на ускоренной экстракции растворителем [59]. Данная методика включала тщательное перемешивание 1г образца с подходящим растворителем и последующим перенесением в 10 мл экстракционную ячейку. Одного экстракционного цикла в присутствии абсолютного этанола при температуре  $80^{\circ}\text{C}$  достаточно для обеспечения выделения 90% коэнзима  $Q_{10}$  [59].

#### **1.4.4. Восстановление экстрагированных форм**

Окончательная стадия процесса подготовки образцов это удаление остатков растворителя, используемого при экстракции. Оно достигалось путем пропускания слабого тока инертного газа через экстракт и последующим растворением сухого остатка в небольшом объеме подходящего растворителя. Высушивание под воздействием азота наиболее часто используемый метод. Аргон также используется для этих целей, хотя,

заметно реже [36]. В случае большого количества экстракта применяли выпаривание под воздействием низких давлений [39,42].

Процесс высушивания зачастую очень громоздкий и долгий шаг, особенно когда имеет место большое количество образца. Дополнительно, существует риск выдувания аналита при использовании сильного потока газа. Обзор всех недостатков данного процесса приводит к тому, что исключение процедуры восстановления экстрагированных форм кажется наиболее благоприятной [28]. Моска и соавторы предложили применять непосредственное введение *n*-Пропанола в плазму крови без необходимости предварительного удаления избыточного растворителя (высушивания). Полученный коэффициент точности определения коэнзима был очень высок – около 2% для измерений, выполняемых в течение нескольких дней.

### **1.5. Методы определения коэнзима Q<sub>10</sub>**

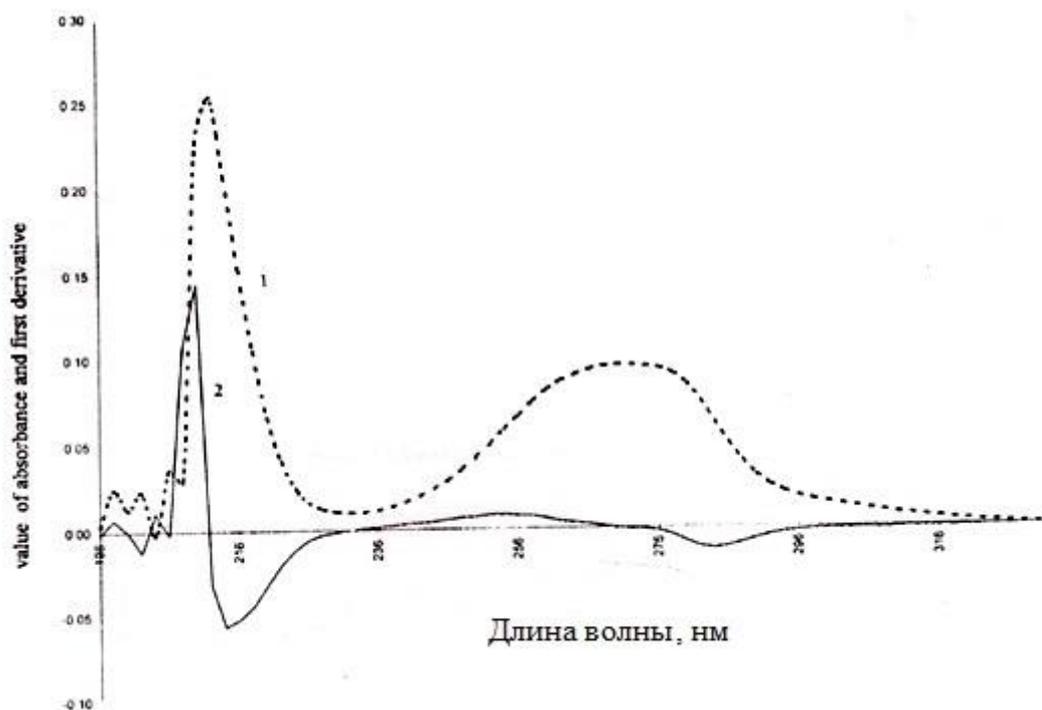
В настоящее время для определения коэнзимов Q применяют три основные группы методов: спектрофотометрические, хроматографические и электрохимические.

#### **1.5.1. Спектрофотометрические методы**

В настоящее время спектрофотометрические методы используются исключительно для количественного определения коэнзима Q<sub>10</sub> в биологических объектах. По сравнению с хроматографическими методами, спектрофотометрия требует значительных затрат образца материала и характеризуется низкой селективностью и чувствительностью. Однако, данные методы очень часто используются для быстрого определения коэнзима Q<sub>10</sub> в фармацевтических препаратах [59]. В самом начале изучения коэнзима Q<sub>10</sub> предложили несколько методов для определения коэнзима в биологических объектах. Кониужу и соавторы [60] предложили колориметрический метод определения убихинона в моче человека. Методика основана на реакции нуклеофильного замещения метоксигрупп цианэтилацетатом в присутствии гидроксида калия, с образованием

соединения, имеющего интенсивное голубое окрашивание и характерный спектр поглощения при длине волны 625 нм. Так же, данную реакцию применяли для определения уровня убихинона в крови человека [20]. Однако, данная методика имеет существенный недостаток, при анализе образцов, которые содержали большое количество жиров наблюдалась значительная ошибка анализа. УФ-спектр окисленной формы коэнзима Q<sub>10</sub> имеет две полосы на 240 и 275 нм, в то время как восстановленная форма имеет УФ-спектры на 240 и 290 нм. Спектрофотометрический анализ при 275 нм был применен для определения убихинона в тканях *penetrocephalis ganadpatii* [43].

В работах [61, 62] предложили метод дифференциальной спектрофотометрии для анализа фармацевтических препаратов, основными компонентами которых являются коэнзим Q<sub>10</sub>, токоферол и ретинол ацетат. Методика не требует проведения предварительной пробоподготовки (разделение и осаждение) и может быть использована при потоковых анализах. Для разделения аналитических сигналов исследуемых веществ, рассматривали спектры второго порядка (рис. 1.11). Предел обнаружения коэнзима Q<sub>10</sub> составил 1,1 мкг/см<sup>3</sup>.



**Рисунок 1.11.** Спектр поглощения раствора коэнзима  $Q_{10}$  в гексане (5 ppm) и его первая производная. 1 – спектр поглощения; 2 – первая производная.

Основными недостатками спектрофотометрических методов анализа является узкий спектр исследуемых объектов, большое влияние сопутствующих веществ на аналитический сигнал и небольшая чувствительность методик.

### 1.5.2. Хроматографические методы со спектрофотометрическим и электрохимическим детектированием

Из-за неполярной природы коэнзима  $Q_{10}$  и его гомологов для их анализа предложили использовать обращенно-фазовую ВЭЖХ [63]. В работе [64] показано, что данный метод имеет ряд превосходств по сравнению с нормально-фазовым вариантом, это: воспроизводимость и большая селективность при совместном определении коэнзима  $Q_{10}$  и его аналогов. Согласно литературным данным, наиболее часто применяют электрохимическое и спектрофотометрическое детектирование.

В работе [65] предложили метод определения коэнзима  $Q_{10}$  в плазме крови и мышечной ткани с использованием в качестве внутреннего стандарта

ди-пропокси- $\text{CoQ}_{10}$ . Образец мышечной ткани гомогенизировали, затем добавляли  $50 \cdot 10^{-6} \text{ дм}^3$  дипропокси- $\text{CoQ}_{10}$  и проводили экстракцию методом последующей сменой растворителя. Сигнал коэнзима  $\text{Q}_{10}$  детектировался при длине волны 275 нм. Предел обнаружения  $6 \text{ нмоль/дм}^3$  достаточен для определения коэнзима  $\text{Q}_{10}$  в фармацевтических препаратах.

Авторы работы [66] разработали методику определения коэнзима  $\text{Q}_{10}$  в ряде биологических объектов: моче, плазме и тканях органов. В качестве внутреннего стандарта использовали раствор коэнзима  $\text{Q}_{10}$  в гексане. Для проведения анализа использовалась колонка FinePack C18 (4,6x250 мм). Подвижная фаза состояла из смеси метанола с гексаном в соотношении 3:1. Сигнал коэнзима детектировался при длине волны 275 нм. Предел обнаружения составил  $10 \text{ нг/дм}^3$ .

В работе [67] описан метод совместного определения а-токоферола, ретинола и коэнзима  $\text{Q}_{10}$  в плазме крови человека. Разделение проводили при использовании колонки LiChrospher 100 RP-18 (4x125 мм, размер зерна 5 мкм), подвижная фаза состояла из смеси метанола с гексаном в соотношении 70:30. Спектрофотометрическое детектирование осуществляли при длине волны 276 нм. Предел обнаружения убихинона составил  $0.83 \text{ мкмоль/дм}^3$ .

В работе [28] описан простой и экспрессный метод определения общего содержания коэнзима  $\text{Q}_{10}$  в плазме. Для перевода коэнзима  $\text{Q}_{10}$  в окисленную форму к  $0,2 \cdot 10^{-3} \text{ дм}^3$  плазмы добавляли 1,4-бензохинона ( $2 \text{ мг/см}^3$ ) в объеме  $50 \cdot 10^{-6} \text{ дм}^3$ , проводили реакцию в течение 10 минут, затем осаждали белки добавлением  $1 \text{ см}^3$  *n*-Пропанола. После центрифугирования отбирали надосадочную жидкость и проводили ее хроматографическое исследование. Разделение проводилось на стандартной колонке Supelcosil LC 18.

Для одновременного определения восстановленной и окисленной формы использовали кулонометрическое детектирование. Коэнзим  $\text{Q}_{10}$  восстанавливали при потенциале -500 мВ, и дальнейшее определение проводили при 350 мВ. Электропроводность раствора обеспечивали

введением в подвижную фазу 50 мМ перхлората натрия. Предел обнаружения при использовании кулонометрического детектирования составил 5 мкг/дм<sup>3</sup>. Авторы работы [68] проводили разделение восстановленной и окисленной форм CoQ<sub>9</sub> и CoQ<sub>10</sub> при помощи обращенно-фазовой колонки Microsorb-MV (основные параметры: 4,6x150 мм, размер зерна 5 мкм). Подвижная фаза для хроматографического анализа состояла из смеси безводного ацетата натрия (4,2 г) в смеси 15 см<sup>3</sup> уксусной кислоты, 140 см<sup>3</sup> гексана, 15 см<sup>3</sup> изопропанола и 830 см<sup>3</sup> метанола. Кулонометрическое детектирование осуществляли по следующей схеме: окисление электроактивных содержимых образца в предколоночной кондиционирующей ячейке, затем, элюат подавали в дополнительную защитную ячейку и подавали на электрод потенциал 0,7 В. Затем вещества помещали в аналитическую ячейку с двумя последовательными электродами для проведения процесса восстановления и детектирования. Потенциалы электродов для восстановления и детектирования устанавливали равными -1 и 0,45 В, соответственно. Для определения общего количества коэнзимов с использованием кулонометрического детектирования при потенциале электрода в ячейке 0.7 В, при необходимости раздельного определения восстановленной и окисленной формы коэнзима Q<sub>10</sub> потенциал электрода составил -0,075 В. Стандартные растворы CoQ<sub>9</sub>H<sub>2</sub> и CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> готовили переводом окисленных форм в восстановленные раствором боргидрида натрия. Предел детектирования составил 15 мкг/дм<sup>3</sup>.

Так же похожую методику предложили авторы в работе [19]. Определение окисленной и восстановленной формы коэнзима Q<sub>10</sub> в плазме крови проводили методом ВЭЖХ с электрохимическим детектированием. Разделение окисленной и восстановленной форм коэнзима Q<sub>10</sub> и проводили при помощи колонки Hypersil C18 (4x125 мм, размер зерна сорбента 5 мкм), в качестве подвижной фазы использовали смесь перхлората натрия в растворе метанол:этанол:трет-бутанол. Определение осуществляли

амперометрическим детектированием. В качестве индикаторного электрода использовался стеклоуглеродный электрод (СУЭ) ( $E=700$  мВ), в качестве электрода сравнения использовали хлорсеребряный электрод (ХСЭ). Для определения окисленной и восстановленной формы эксперимент проводили два раза. Без обработки и с обработкой раствора боргидритом натрия в метаноле. Предел детектирования составил  $2$  мкг/дм<sup>3</sup>.

В работе [68] определяли отношение окисленной и восстановленной форм  $\text{CoQ}_9$  и  $\text{CoQ}_{10}$  в тканях органов человека и крыс. Анализ проводили на колонке Hypersil ODS (с диаметром зерна  $3$  мкм). Градиентное элюирование проводилось в смеси метанол:вода:гексан:изопропанол, разделение окисленной и восстановленной форм коэнзимов  $6$ ,  $9$  и  $10$  достигалось за  $50$  минут.

В работа [69] авторы определяли жирорастворимые антиоксиданты в плазме крови человека:  $\gamma$ -токоферол,  $\beta$ -каротин,  $\alpha$ -токоферол, убихинол и убихинон, ликопен. Для анализа использовали колонку Supelcosil LC-8-DB (основные параметры:  $4,6 \times 150$  мм, размер зерен  $3$  мкм) как подвижная фаза использовали раствор  $20$  мкМ перхлората лития в смеси метанол:вода в соотношении  $96:4$ . Детектирование осуществляли при помощи кулонометрического детектора с подключенной двухэлектродной ячейкой (потенциалы электродов  $0,01$  и  $0,35$  В). Разделение компонентов достигали за  $35$  минут.

### **1.5.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием**

Преимущество анализа коэнзимов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием заключается в высокой чувствительности данного метода анализа, а также в возможности определения коэнзимов в сложных смесях благодаря высокой селективности и достоверности метода.

При использовании масс-спектрометрического детектирования возможно одновременно определять окисленную и восстановленную форму коэнзима при достаточно большом влиянии матрицы, используя простые методы пробоподготовки. Наиболее часто данный метод используется при анализе биологических объектов.

В работе [128] описано количественное определение коэнзима  $Q_{10}$  в продуктах питания методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Анализ осуществляли на колонке Luna C18 (4.6×150 мм, 3 мкм) в качестве подвижной фазы использовали раствор из этанола, диоксана и уксусной кислоты. При данных условиях, время удержания коэнзима  $Q_{10}$  составило  $4.1 \pm 0.1$  мин. Качественное и количественное определение проводили с применением источника химической ионизации в режиме регистрации положительных ионов. Предел обнаружение 0.1 мг/кг.

В работе [70] определили содержание  $CoQ_{10}$  в табачных листьях. Идентификацию осуществляли при помощи масс-спектрометра фирмы Finnigan с применением электрораспылительной ионизации в режиме регистрации положительных ионов. Для пробоподготовки свежие листья табака экстрагировались в безводном этаноле 15 минут под воздействием ультразвука. Затем, полученная смесь экстрагировалась в гексане. Анализ осуществляли на колонке Symmetry Shield RP 18. Разделение проводили в смеси, состоящей из 0.5% муравьиной кислоты в растворе ацетонитрила и изопропанола в соотношении 8:7. Предел обнаружения составил  $1,2 \text{ нг/см}^3$ .

В работе [71] представлен метод для определения коэнзима  $Q_{10}$  в плазме крови методом жидкостной хроматографии с различными видами детектирования: масс-спектрометрическим и электрохимическим. В работе использовали масс-спектрометрический детектор, оснащенный ионной ловушкой и двумя источниками ионизирующего излучения: электроспрей и химическая ионизация при атмосферном давлении. Авторы работы исследовали влияние различной ионизации на регистрацию положительных и

отрицательных ионов. Оптимальные результаты были получены при регистрации отрицательных ионов. В выбранных условиях предел обнаружения составил  $1 \text{ нг/см}^3$ .

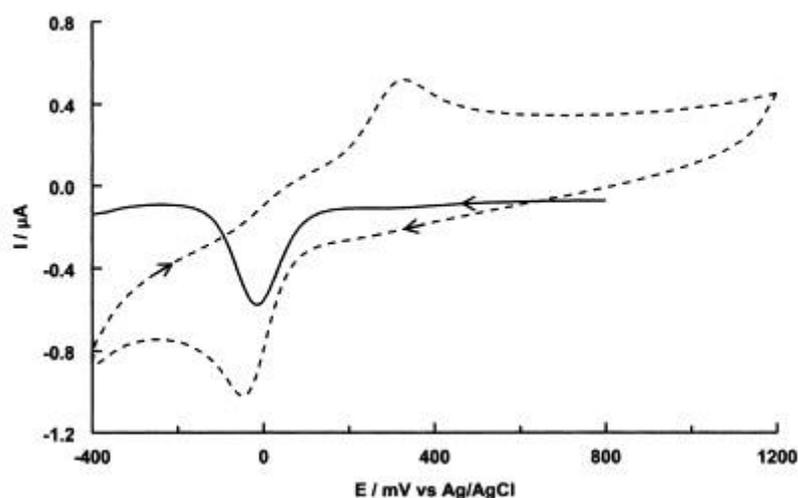
На основании вышеизложенных данных можно сделать вывод, что при анализе коэнзимов методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием мешающее влияние матрицы оказывается велико и данный метод не обладает необходимой селективностью и чувствительностью для анализа биологических объектов. Метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием обладает всеми параметрами необходимыми для определения ряда коэнзимов как в биологических, так и в фармацевтических объектах, однако, из-за высокой стоимости оборудования данный метод не получил широко применения. Метод ВЭЖХ с электрохимическим детектированием обладает высокой чувствительностью и селективностью, а так же данным методом возможно проводить одновременное определение окисленной и восстановленной формы коэнзима Q, что является немаловажной задачей при анализе биологических объектов [21, 72, 73].

#### **1.5.4. Электрохимические методы**

Наличие электрофорных групп в составе коэнзима Q<sub>10</sub> и его производных позволяет использовать для их определения электрохимические методы. Полярографические методы сложно использовать в качестве аналитического метода для определения коэнзима Q<sub>10</sub>. Янг и Сонг [74] предложили использовать полярографический метод для определения коэнзима Q<sub>10</sub>. В основе данного метода лежит образование коэнзимом Q<sub>10</sub> комплекса включения с β-циклодекстрином в присутствии йодид-иона в 0,1 М ацетатном буфере с рН 4,7. Линейная область была получена в диапазоне концентраций от  $6.0 \cdot 10^{-8}$  до  $2.5 \cdot 10^{-7}$  моль/дм<sup>3</sup>, предел обнаружения составил  $1.0 \cdot 10^{-8}$  моль/дм<sup>3</sup>.

В работе [2] авторы предложили вольтамперометрический метод количественного определения коэнзима Q<sub>10</sub> в фармацевтических формах.

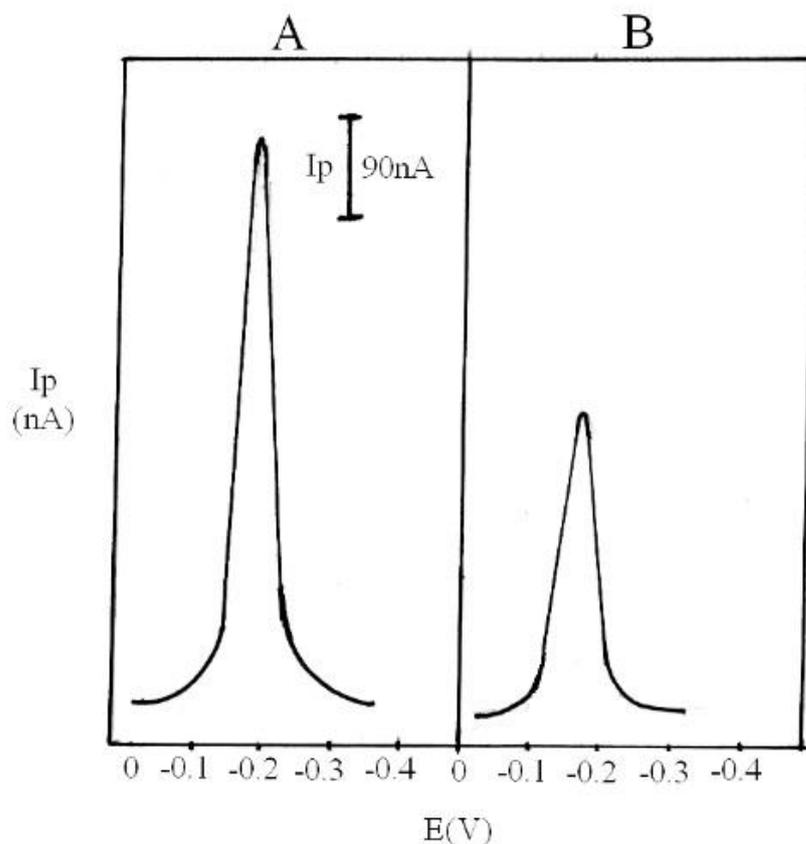
Эксперимент проводили на электрохимическом анализаторе model EA9C, с подключенной к нему трехэлектродной ячейкой. В качестве индикаторного электрода использовали СУЭ ( $d = 1 \text{ мм}^2$ ,  $S = 7.85 \cdot 10^{-3} \text{ см}^2$ ) в качестве электрода сравнения – платиновый. Стандартный раствор коэнзима  $Q_{10}$  готовили растворением необходимой навески в смеси уксусная кислота : ацетонитрил (80 : 20). В качестве фонового электролита использовали уксусную кислоту, содержащую 20% ацетонитрила и 0.5 М раствор ацетата натрия. При увеличении концентрации ацетонитрила в растворе наблюдалось уменьшение растворимости алликувоты в фоновом электролите. Электрохимический сигнал восстановления убихинола получили при потенциале  $E = -20 \text{ мВ}$  (рис. 1.12). Предел обнаружения составил 0.014 мМ.



**Рисунок 1.12.** Циклические вольтамперограммы коэнзима  $Q_{10}$  в уксусной кислоте, содержащей 20% ацетонитрила и 0.5 М раствор ацетата натрия, полученные методами циклической (---) и дифференциально-импульсной (-) вольтамперометрии при скорости развертки 20 мВ/сек.

Авторы работы [75] предложили использовать квадратно-волновую вольтамперометрию для определения коэнзима  $Q_{10}$ . В качестве индикаторного электрода использовали ртутно-капающий электрод, хлорид-серебряный и платиновый использовали в качестве электрода сравнения и вспомогательного, соответственно. Стандартный раствор коэнзима  $Q_{10}$

готовили путем растворения необходимой навески в этаноле с последующим нагреванием. В качестве фонового электролита использовали водный фосфатный буферный раствор pH 7.3. Сигнал восстановления коэнзима Q<sub>10</sub> нашли в области потенциалов  $E = -0.20$  В. Предел обнаружения составил  $1.3 \cdot 10^{-7}$  М. Так же авторы обнаружили значительное уменьшение сигнала электровосстановления коэнзима Q<sub>10</sub> в присутствии альбумина (рис. 1.13)



**Рисунок 1.13.** Квадратно-волновая вольтамперограмма электровосстановления коэнзима Q<sub>10</sub> в фосфатном буферном растворе (pH 7.3) в отсутствии (А) и присутствии (В) альбумина.

В работе [76] авторы использовали метод квадратно-волновой вольтамперометрии для определения коэнзима Q<sub>10</sub> в фармацевтических препаратах. В качестве аналитического сигнала использовали сигнал восстановления убихинона при  $E = 0.190 - 0.300$  В. Все вольтамперометрические измерения производили на анализаторе Galvanostat/Potentiostat Model 273А с подключенной трехэлектродной

микроячейкой. В качестве индикаторного электрода использовался СУЭ (площадь рабочей поверхности  $3.14 \cdot 10^{-3} \text{ см}^2$ , ХСЭ и платиновый электрод использовали как электрод сравнения и вспомогательный, соответственно. Все измерения проводили при  $25^{\circ}\text{C}$ . Стандартный раствор убихинона готовили путем непосредственного растворения навески данного вещества в гексане. В качестве фонового электролита использовали смесь: гексан : метанол (1:2) – 0.12 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в метаноле. Мешающее влияние кислорода удалялся продувкой аргона через раствор в течение 15 минут. Предел обнаружения составил  $10^{-7}$  М.

Основными недостатками имеющихся электрохимических методик являются использование токсичных растворителей и трудоемкой пробоподготовки. Кроме того, почти все методики разработаны для фармацевтических препаратов, где содержание коэнзима достаточно большое (от 50% до 99%). Вольтамперометрических методик для определения коэнзима в косметических средствах и биологических объектах не найдено. Также наблюдается неустойчивость сигнала из-за нестабильности форм коэнзима в растворе.

#### **1.6. Методы определения антиоксидантов и антиоксидантной активности объектов**

В настоящее время по результатам многих исследований показано, что биохимические реакции в организме идут с образованием или при участии свободных радикалов. Их концентрация контролируется физико-химическими процессами, происходящими в организме, повреждение которых приводит к возникновению окислительного стресса. Поэтому в настоящее время контроль за содержанием антиоксидантов как в БАД, косметической, фармацевтической продукции, так и биологических объектах является актуальной задачей. Возрастающий интерес в применении антиоксидантов вызывает дальнейшее развитие методов их исследования, как по отдельности, так и в составе сложных смесей.

Механизмы перекисного окисления и механизмы действия природных и экзогенных антиоксидантов изучаются по двум направлениям - *in vitro* и *in vivo*. Методы исследования *in vivo* имеют ряд неоспоримых преимуществ, однако, интерпретация полученных данных является неоспоримой задачей ввиду сложности процессов, протекающих в организме. В связи с этим в настоящее время возрастает интерес к исследованиям *in vitro*. Данные исследования позволяют детально изучить влияние различных соединений на процессы окисления в модельных средах, позволяющих исследовать свободнорадикальные процессы при взаимодействии про- и антиоксидантов.

### **1.6.1. Хемилюминесцентные методы определения антиоксидантов**

Хемилюминесцентные (ХЛ) методы широко применяют для оценки интенсивности свободнорадикальных процессов. Они основаны на способности липидных структур, входящих в состав тканей и биосред, испускать спонтанное непрерывное сверхслабое свечение в видимой области спектра [77]. Экспериментально установлено, что в результате свободнорадикального окисления липидов возникает биохемилюминесценция. Кванты видимого участка спектра, генерируемые при этих процессах, являются продуктами перекисного окисления липидов (ПОЛ). Реакция рекомбинации перекисных липидных радикалов является основным источником ХЛ, поэтому при усилении данных процессов имеет место повышение спонтанной ХЛ. ХЛ ослабляется в присутствии ингибиторов свободнорадикальных реакций из-за снижения концентрации перекисных радикалов.

Реакционная способность радикалов очень высокая, что приводит к уменьшению сроков их существования, этим их свойством обусловлена высокая эффективность ХЛ методов анализа [78]. Наиболее часто для определения интенсивности ХЛ используют вещества, которые повышают квантовый выход и увеличивают свечение. Хелат европия ( $\text{Eu}^{3+}$  - 1,10 фенантролин-трис (теноил-трифторацетонат)) наиболее часто используют в

качестве такого вещества [79]. Так же в работах [80, 81] в качестве хорошо люминисцирующих веществ показано применение антрацена. Установлено, что влияние на ХЛ подобных производных антрацена качественно одинаково, но они сильно различаются по усиливающему действию. Хорошими активаторами являются те, у которых с ростом концентрации монотонно увеличивается коэффициент усиления, к ним относятся химически устойчивые и неактивные производные антрацена. Активаторы можно считать условно плохими, если они являются фитохимически активными и химически нестойкими производными антрацена, у них мало усиливающее действие, коэффициент усиления проходит через максимум и наблюдается тушение свечения при высоких концентрациях.

При изучении антиоксидантной активности (АОА) часто используют модельные системы окисления люминола, индуцированное  $H_2O_2$  [82,83]. Сверхслабое свечение, которое регистрируется квантометрическими установками, образуется при воздействии пероксида водорода на ненасыщенные жирные кислоты, белки, а также аминокислоты. Для возникновения цепных окислительных реакций также используют 2,2-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорид (АБАП). Он подвергается термодинамической деградации, в результате которой образуются пероксильные радикалы, которые способны взаимодействовать с водорастворимыми перехватчиками такими как: фикоэритрином, люминолом и эмульсией линолевой кислоты [84].

В работе [85] в качестве модельного процесса приведено низкотемпературное окисление классических углеводородов, таких как: кумол, дифениламин и этилбензол в малополярном инертном растворителе – хлорбензоле, активированные азодиизобутиронитрилом (АИБН). В данной работе АОА подсолнечного и кукурузного масел оценивалась степенью влияния антиоксиданта хроманта  $C_1$  на кинетику хемолюминисценции.

В работах [86,87] предложен способ определения АОА препаратов, приготовленных из растительного сырья методом фотосенсибилизированной экзолюминисценции. В качестве субстрата окисления пептида использовался глицилтриптофан, в качестве сенсibilизатора – рибофлавин. Для определения антиоксидантных свойств раствор глицилтриптофана облучали светом при длине волны  $\lambda=436$  нм при добавлении рибофлавина. Супероксид анион-радикалы полученные в результате реакции взаимодействия кислорода с триплетно-возбужденными молекулами рибофлавина обеспечивали образование люминисцирующего продукта.

В настоящее время выявлены соединения-ингибиторы, которые являются достаточно активными радикалами способными не только участвовать в реакции взаимодействия с перекисными радикалами, но и вызывают их рекомбинацию. В работе [88] выведено уравнение, дающее возможность оценить константу скорости протекания реакции взаимодействия перекисных радикалов с антиоксидантами, когда нельзя пренебречь влиянием радикала-ингибитора на процесс.

Кроме того, при определении антиоксидантной активности хемилюминисцентными методами необходимо учитывать и влияние других компонентов, входящих в модельную систему. Например, такие соединения как диоксетаны способны распадаться по безрадикальному механизму и сами давать ХЛ [89]. Поэтому для получения достоверных данных при определении АОА хемилюминисцентными методами необходимо учитывать мешающее влияние матрицы (паразитную люминисценцию).

### **1.6.2. Кинетические методы определения антиоксидантов**

Второй метод, наиболее часто используемый для определения АОА это газометрический кинетический метод. Данный метод основан на изменении кинетики протекания реакции окисления углеродов, в присутствии исследуемых веществ. Анализ проводится на манометрических установках, впервые они появились в конце 40-х годов двадцатого века. Правильность

результатов анализа зависит от верности измерения скорости поглощения кислорода, в результате реакции. Особенно, это имеет значение в начале эксперимента, когда анализируемое вещество может значительно замедлить скорость реакции. В сложных объектах, в которых могут присутствовать сразу несколько ингибиторов окисления, которые имеют различную константу скорости ингибирования особо важное значение имеет точность измерения скорости поглощения кислорода в результате реакции [78].

В работах [90,91] кинетическое моделирование процесса цепного окисления углеводов, осуществлялось на высокочувствительной дифференциальной манометрической установке. Она позволяет варьировать диапазон температур от 40 до 160°C, измерять расход концентрации кислорода в диапазоне скоростей от  $10^{-8}$  до  $10^{-3}$  моль/л·с, проводить опыты длительностью от сотен секунд до нескольких часов, это дает возможность исследовать исходные вещества в широких пределах концентрации. Метиллинолет применяли как модельный субстрат для определения антирадикальной активности исследуемых веществ. Метиллинолет является хорошей модельной системой при исследовании ПОЛ. В результате представленных работ был изучен механизм действия таких ингибиторов как: антиоксидант С-47 (ароматический диамин) и ионол. Полученные результаты доказали, что метод кинетического моделирования может быть применен в изучении антиокислительных свойств, так как данный метод дает возможность детально изучить ингибированное окисление метиллинолеата.

В работе [92] для анализа антиоксидантной активности использовали модельную реакцию индуцированного окисления кумола. Измерение расхода концентрации кислорода производили на высокоточном газометрическом устройстве. Его принцип работы основан на машинальном уравнивании перепада давления, образующегося в результате поглощения кислорода исследуемыми веществами, соответствующим количеством кислорода в виде пузырьков определенного радиуса, радиус (размер) пузырька является

величиной постоянной и зависит от величины поверхностного натяжения и диаметра капилляра. Данный методом использовался для определения АОА вытяжки и отдельных компонентов, выделенных из побегов водянки черной.

Для определения антиоксидантной активности компонентов, имеющих сложный химический состав в работе [93] использовался манометрический способ, основанный на реакции свободнорадикального окисления сульфит-иона и разложении  $\text{H}_2\text{O}_2$  с последующим построением кинетических кривых, описывающих данный процесс. При окислении сульфит-иона происходит выделение кислорода, по изменению количества которого в результате его взаимодействия с исследуемыми образцами и происходит оценка АОА.

Кинетический метод исследования реакции свободнорадикального окисления широко используется для оценки АОА. Однако, при исследовании антиоксидантной активности токоферола кинетическим и хемилюминисцентным методами, ХЛ методы оказались наиболее точными [94]. ХЛ методы являются наиболее прямым способом для оценки АОА и изучения их кинетических свойств по сравнению с кинетическими методами определения АОА.

Не смотря на все описанные выше преимущества, ХЛ методы обладают и рядом недостатков, таких как: длительность, трудоемкость и высокая стоимость анализа. Поэтому в настоящее время начали появляться высокочувствительные, селективные и автоматизированные методы определения АОА.

### **1.6.3. Спектроскопические методы анализа антиоксидантной активности**

В работе [95] описан микроколлометрический метод для оценки антирадикальной эффективности эфирных масел, основанный на модельной реакции радикального инспирирования окисления производных кумола. В микроколлометрическом методе регистрируется тепловой эффект реакций радикального окисления и полимеризации, что позволяет рассчитать

эффективность антиоксидантов по периоду индукции. Константа скорости взаимодействия перекисных радикалов с ингибитором рассчитывается по увеличению величины тепловыделения в течении периода инспирирования.

В работе [96] описан метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), являющийся разновидностью магнитной радиоспектроскопии, это наиболее прямой физический метод, применяемый при изучении поведения свободных радикалов. Сущность метода заключается в том, что в результате взаимодействия окисляемой молекулы с кислородными радикалами, образующимися при распаде перекисных соединений, в результате цепных реакция окисления обладают парамагнитными свойствами. Их определение осуществляется путем регистрации интенсивности соответствующего сигнала спектра ЭПР.

В работе [97] предложен метод ЭПР, основанный на способности антиоксидантов реагировать с радикалами  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{H}^\bullet$  и  $\hat{\epsilon}$ . Оценка АОО производится по уменьшению ЭПР спектра в результате взаимодействия того или иного радикала с анализируемым веществом на величину, пропорциональную концентрации радикала.

В работе [98] описан метод подобный представленному выше, только в качестве стабильных радикалов в данном методе используют стабильные нитроксильные и гидразильные радикалы. Детектирование этих радикалов осуществляется ЭПР или спектрофотометрическими методами.

В работе [99] предложен спектрофотометрический метод определения АОО вина. Из дигидрохлорида *N,N*-диметил-*n*-фенилендиамина в присутствии  $\text{FeCl}_3$  в качестве окисляющего агента получают катион-радикалы, которые дают пик абсорбции при длине волны  $\lambda = 514$  нм. Антиоксидантные свойства исследуемых веществ оценивали по уменьшению спектра поглощения раствора в присутствии анализируемых объектов.

В работе [100] представлен фотометрический метод определения антиоксидантной активности, основанный на реакции восстановления

антиоксидантами фосфорномолибденовой кислоты. При взаимодействии фосфорномолибденовой кислоты с ОН-группами полифенолов образуется комплекс синего цвета, дающий спектр при длине волны  $\lambda = 760$  нм.

В работе [101] с биологическими объектами очень часто в качестве модельной реакции используют реакцию взаимодействия между малоновым диальдегидом и тиобарбитуровой кислотой, которая протекает в кислой среде при воздействии высоких температур. В результате реакции образуется триметиновый интенсивно окрашенный комплекс, который имеет максимум поглощения при длине волны  $\lambda = 532$  нм. По уменьшению интенсивности спектра поглощения при внесении исследуемых веществ в ячейку можно судить о АОА исследуемых веществ.

В работах [102-104] представлен колориметрический метод определения АОА, получивший название FRAP (ferric reducing antioxidant power), основанной на способности антиоксидантов восстанавливать  $\text{Fe}^{3+}$  до  $\text{Fe}^{2+}$ . При взаимодействии  $\text{Fe}^{2+}$  с 2,4,6-три(2-пиридил)-цис-тразином образуется окрашенный комплекс, дающий пик поглощения при  $\lambda = 595$  нм. Данный метод широко применяется в оценке АОА пищевых продуктов. Однако у данной методики есть существенный недостаток - она позволяет определять АОА только тех веществ, у которых восстановительный потенциал больше потенциала, при котором происходит превращение  $\text{Fe}^{3+}$  в  $\text{Fe}^{2+}$ .

#### **1.6.4. Электрохимические методы исследования антиоксидантной активности**

В настоящее время возрастает интерес к применению электрохимических методов для оценки антиоксидантной активности. По сравнению с общепринятыми методами (газометрия и хемилюминисценция) электрохимические методы обладают рядом преимуществ: высокая чувствительность, экспрессность и простота аппаратного оформления.

В России электрохимические методы, благодаря своим преимуществам, нашли широкое применение. В последнее время было создано достаточное

количество электрохимических методов для исследования антиоксидантной активности рядом электрохимических школ России.

#### **1.6.4.1. Кулонометрическое определение интегральной антиоксидантной емкости объектов**

Для оценки интегральной антиоксидантной емкости объектов исследования (фитопрепараты, биологические объекты, фармпрепараты) в работах [105-109] использовался метод кулонометрического титрования при использовании в качестве электрогенеративных элементов различных соединений хлора и брома. На поверхности платинового электрода проводили окисление соединений брома до образования бромид-ионов  $\text{Br}_2^-$  и  $\text{Br}_3^-$ , также в процессе протекания реакции на поверхности платинового электрода адсорбируются радикалы брома ( $\text{Br}^\bullet$ ).

Использование соединений брома как электрогенерируемых соединений позволяет использовать данный метод применительно к широкому спектру антиокислительных объектов из-за простоты их получения и способности принимать участие в радикальных и окислительно-восстановительных реакциях, а также вступать в реакции электрофильного присоединения и замещения, протекающие по кратным связям.

В данном методе для оценки антиоксидантной активности впервые было введено понятие интегральной антиоксидантной емкости (АОЕ). Она выражается в количестве электричества (кулоны), которое затрачивается при титровании 1  $\text{дм}^3$  крови или 100 г препарата.

Расчет интегральной антиоксидантной емкости проводят по формуле:

$$Q = I \cdot t / V_{\text{ал}} [\text{кКл}/\text{дм}^3]$$

Где, Q – количество электричества, необходимое на титрование 100 г препарата или 1  $\text{дм}^3$  образца [ $\text{кКл}/\text{дм}^3$ ];

I – сила тока, А;

t – время, затраченное на полное титрование объекта, сек;

$V_{\text{ал}}$  - объем аликвоты,  $\text{дм}^3$ .

По сравнению с остальными существующими, методами данный метод обладает более высокой точностью определения, а использование соединений бора в качестве электрогенерируемого титранта делает этот метод экспрессным и доступным.

#### **1.6.4.2. Потенциометрический метод определения антиоксидантной активности**

В работах [110,111] для определения общей антиоксидантной активности предлагается использовать потенциометрический метод, основанный на медиаторной системе  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ .

Суммарную антиоксидантную активность объектов рассчитывали по формуле:

$$X = \alpha(C_{ox} - C_{red})/(1 + \alpha)$$

Где, X – концентрация антиоксидантов, реагирующих с окисленными компонентами медиаторной системы [моль·экв/дм<sup>3</sup>];

$C_{ox}$  – концентрация окисленной формы медиаторной пары [моль·экв/дм<sup>3</sup>];

$C_{red}$  – концентрация восстановленной формы медиаторной пары [моль·экв/дм<sup>3</sup>];

$\alpha$  – коэффициент, выведенный для данного метода анализа и рассчитываемый по формуле:

$$\alpha = 10^{(E-E_1)/b} \cdot C_{red}/C_{ox}$$

Где,  $b = 2.3RT/nF$ ,  $n=1$

Данный метод используется для исследования антиоксидантной активности природных и синтетических антиоксидантов [112]. Установлена высокая степень корреляции определения суммарной противорадикальной и антиоксидантной активности различными методами (потенциометрия, фотохемилюминисценция, фотоколориметрия и др.) Установлены основные метрологические характеристики разработанной методики.

Данный способ наиболее простой и дешевый по сравнению с остальными электрохимическими методами. На основе данного метода разработан потенциометрический антиоксидантный тестер МПА-1.

Авторы работы [113] предложили исследовать антиоксидантную активность коньяка в качестве показателя качества продукции. АОА коньяка определялась потенциометрическим методом, где в качестве медиаторной системы использовалась система на основе различных комплексов  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ . В качестве стандартного вещества использовалась аскорбиновая кислота.

#### **1.6.4.3. Амперометрические и потенциометрические методы определения антиоксидантной активности**

В работе [114-116] для определения АОА экстрактов растений, биологических жидкостей и гомогенатов тканей предложен метод циклической вольтамперометрии. Он основан на способности антиоксидантов, входящих в состав исследуемых веществ восстанавливаться. В качестве веществ-идентификаторов были выбраны низкомолекулярные стандартные антиоксиданты мочева и аскорбиновая кислота. АОА оценивалась по общему содержанию этих веществ в исследуемых веществах методом ВЭЖХ с электрохимическим детектированием. Суммарная АОА оценивалась по изменению величины площади под пиком окисления низкомолекулярных антиоксидантов.

В работах [117,118] предложен амперометрический метод определения АОА, основанный на измерении электрического тока, который возникает при окислении анализируемого вещества (или смеси веществ). О достоверности результатов судили по потенциалу пику окисления. Чувствительность амперометрического метода варьируется использованием индикаторных электродов разной природы, также потенциалом, приложенном к нему. Наиболее часто в качестве индикаторного электрода используется стеклоуглеродный электрод. Электрохимическое окисление используется как модельная реакция для измерения степени поглощения свободных радикалов

исследуемыми антиоксидантами. В данном методе способность к антиоксидантной активности флавоноидами или полифенолами измеряется как величина степени окисляемости представленных соединений на поверхности рабочего электрода амперометрического детектора. При амперометрическом определении хорошо окисляются вещества в состав которых входят гидроксильные группы. Предел обнаружения таких веществ варьируется в диапазоне концентраций от  $10^{-9}$  –  $10^{-12}$  г.

В работах [119,120] показана возможность применения электрода Кларка в определении АОА. В начале его применения он предназначался для определения концентрации кислорода. В классическом методе Кларка используют амперометрическую установку, где платиновый электрод используется в качестве рабочего. Фоновым электролитом выступает водный раствор хлорида калия. Однако, электрод Кларка обладает большой адсорбционной способностью органических соединений на своей поверхности. АОА оценивалась по уменьшению тока восстановления кислорода в зависимости от концентрации исследуемых веществ в ячейке. В связи с этим свойством, использование электрода Кларка для определения АОА возможно только в тех случаях, когда исследуемые вещества являются очень сильными восстановителями и как следствие реагируют с молекулярным кислородом только в объеме, не на поверхности электрода и не являются ПАВ. В связи с этим существенным недостатком в настоящее время электрод Кларка очень редко используется при определении АОА.

В работе [121] определялись производные фенола биоамперометрическим методом при использовании лакказы-нафионового композита. Данный композит наносился на поверхность пироугольного электрода, концентрацию производных фенола оценивали по току восстановления продуктов окисления ферментов при потенциале 0.1В.

В настоящее время широкое применение в оценке антиоксидантной активности нашли биосенсоры. В работах [122,123] для определения общей

антиоксидантной активности был приготовлен биосенсор на основе цитохрома С. Цитохром С наносился на поверхность индикаторного золотого электрода. Ксантиноксидаза используется для ферментативного контроля образования супероксид-радикалов. Добавление исследуемых антиоксидантов в раствор приводит к облегчению разложения радикалов и как следствие к уменьшению тока. Степень АОА рассчитывали по критерию  $IC_{50}$  – концентрация антиоксиданта, при которой происходит уменьшение сигнала на 50%.

В работах [124,125] для определения антиоксидантной активности использовался биосенсор на основе супероксиддисмутазы. В основе метода лежит процесс окисления ксантина до мочево́й кислоты при добавлении энзима ксантиноксидазы, в результате реакции образуются анион-радикалы кислорода. Образование пероксида водорода и кислорода происходит в результате диспропорционирования анион-радикалов кислорода, которые катализируются супероксиддисмутазой, образуемой на преобразователе – платиновом электроде. Образовавшийся пероксид окисляется на аноде, генерируя амперометрический сигнал. По высоте сигнала можно судит о количественном содержании суперанион-радикалов в растворе. При добавлении исследуемого антиоксиданта в раствор он начинает реагировать с суперанион-радикалом, снижая его концентрацию в растворе, тем самым интенсивность сигнала снижается. Расчет общей АОА производился по изменению относительного наклона прямой, которая получается при добавлении ксантина в присутствии и при добавлении анализируемого вещества.

#### **1.6.5. Методы, основанные на взаимодействии антиоксидантов с кислородом и его активными радикалами**

В последнее время для определения антиоксидантной активности большой интерес представляют методы, основанные на модельной реакции восстановления кислорода, подобно реакции протекающей в клетках

организма человека и животных. Процесс окисления при участии кислород-радикалов протекает через несколько промежуточных стадий, каждой из которых отводится отдельная роль в процессе жизнедеятельности организма. По особенностям влияния антиоксидантов (АО) на процесс электровосстановления кислорода протекающий в условиях близких к условиям протекания этих процессов в клетках живых систем можно смоделировать простейшие биологические системы.

В работе [126] описан прямой метод определения антиокислительной активности производных L-аминокислот по изменению содержания кислорода в процессе окисления исследуемых аминокислот. В качестве аналитического сигнала используется ток электровосстановления кислорода в отсутствие и присутствии анализируемых веществ, используя метод катодной вольтамперометрии. Авторами была выведена и доказана линейная зависимость между активностью оксидазы и скоростью уменьшения кислорода в растворе. Показано, что предложенный метод хорошо коррелируется и не уступает по точности методу спектрофотометрии. Преимущество данного метода состоит в том, что он позволяет определять антиокислительную активность аминокислот в окрашенных гетерогенных средах.

В работе [127] предложен метод циклической вольтамперометрии и классической полярографии для исследования влияния на процесс восстановления кислорода водорастворимых аминокислот и альбуминов. В зависимости от природы исследуемых веществ наблюдались сдвиги волны электровосстановления кислорода в область положительных или отрицательных потенциалов. Данный метод возможно использовать при определении АОА соединений, способны взаимодействовать с кислородом и его радикалами и при этом взаимодействии происходит изменения формы полярограмм.

В работах [128,129] исследовалось влияние фармпрепаратов и компонентов крови на продукты восстановления кислорода методом импульсной вольтамперометрии на поверхности медного электрода. Применение данного метода дает возможность не только определения антиоксидантной активности, а также установления механизма действия фармпрепаратов и компонентов крови на свободные радикалы организма, путем моделирования процесса их влияния на кислород, радикалы и перекись. При исследовании АОА данным методом на вольтамперограмме была получена предволна, соответствующая процессу восстановления промежуточных продуктов кислорода, например, гидроксильного радикала. Применение данного метода в будущем для исследования антиоксидантной активности биологических объектов, в частности компонентов крови, позволит проводить раннюю диагностику заболеваний, связанных с оксидативным стрессом.

### **1.7. Постановка задачи.**

Как показал литературный обзор, коэнзим  $Q_{10}$  является одним из важнейших биологически активных веществ, который выполняет ряд функций в организме человека и животных. Его недостаток в организме ведет к оксидативному стрессу и, как следствие, к ряду заболеваний. Зачастую недостаток коэнзима  $Q_{10}$  в организме человека и животных покрывается его поступлением с пищей в виде БАД, косметических средств. В связи с этим, возрастает количество БАД и фармацевтических препаратов как на отечественном, так и на зарубежном рынках, включающих в свой состав коэнзим  $Q_{10}$ . Это влечет за собой необходимость постоянного контроля за содержанием коэнзима  $Q_{10}$  в данной продукции, особенно если учесть, что данное вещество неустойчиво на воздухе и быстро подвергается окислительным процессам. На данный момент существует ряд методов определения коэнзима  $Q_{10}$ , но большинство из них требует трудоемкой пробоподготовки, специализированной дорогостоящей аппаратуры, специальных лабораторных условий проведения анализа. Поэтому, разработка простого в аппаратном оформлении, дешевого и чувствительного метода определения коэнзима  $Q_{10}$  в продукции пищевой и косметической промышленности является весьма актуальной задачей.

В данной работе в качестве метода определения коэнзима  $Q_{10}$  использован метод вольтамперометрии, который отличается высокой чувствительностью, удобством в анализе и сравнительно низкой себестоимостью.

## ГЛАВА 2. АППАРАТУРА И МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

### 2.1. Приборы, ячейки, электроды, реактивы и растворы

#### *Оборудование*

Экспериментальные исследования в данной работе проводили на вольтамперометрическом анализаторе ТА-2 (ООО «НПП «Томьаналит» г. Томск, Россия) в комплекте с персональным компьютером.

Анализатор ТА-2 предназначен для автоматизированного анализа методом вольтамперометрии проб пищевых, биологических объектов, косметики, лекарственных препаратов, высокочистых материалов, руд, минералов и т.п. имеет четыре формы разверток поляризующего напряжения: постоянно-токовую, ступенчатую, квадратно-волновую и дифференциально-импульсную. Прибор может работать в двух режимах: простом и дифференциальном. Особенности анализатора: возможность одновременного анализа 3-х разных проб; перемешивание раствора осуществляется путем стабилизированной вибрации индикаторного электрода; возможность обработки анализируемых растворов инертным газом и озоном; программный способ реализации анализа; встроенная УФ-лампа для устранения мешающего влияния кислорода и разрушения органических веществ; возможность работы в двух – и трехэлектродном режимах. Анализатор работает в комплекте с персональным компьютером, операционная система MS Windows XP/7. Чувствительность анализатора составляет порядком  $5 \cdot 10^{-11}$  А; высокая чувствительность и воспроизводимость аналитических сигналов 10-15%; продолжительность одновременного анализа трех проб (5-30 мин.).

Спектрофотометрические измерения проводили на флуориметре Agilent Technology Cary 60 UV-Vis, подключенный к персональному компьютеру. Прибор позволяет производить измерения в спектральном диапазоне от 190 до 1100 нм, фотометрический диапазон 3.3 А, максимальная скорость сканирования 24000 нм/мин.

Подготовка и проверка работы вольтамперометрических анализаторов ТА-2 и АОА, а так же флуориметра Agilent Technology, совмещенных с персональным компьютером производили в соответствии с инструкцией по эксплуатации и техническому описанию соответствующего прибора.

Для варьирования концентрации кислорода в растворе вплоть до его полного удаления через раствор пропускали газообразный азот с массовой долей кислорода не более 0,003% из баллона под давлением через силиконовый шланг со съемной трубкой с узким наконечником.

Для контроля рН применяли лабораторный рН-метр-150М (Россия), предназначенный для оперативного определения активности ионов водорода рН. рН-метр-105М контролируется электродом ЭСКЛ-08М и автоматическим термокомпенсатором ТКА-8М. Электрод ЭСКЛ-08М, является лабораторным комбинированным стеклянным электродом общего назначения со встроенным одноключевым электродом сравнения.

Взвешивание точной навески вещества проводили на лабораторных аналитических весах общего назначения А&D HL-400 «Госметр» (Россия) с погрешностью взвешивания не более 0.0002 г.

«Аквадистилятор ДЭ-4» использовали для получения дистиллированной воды.

В качестве электрохимической ячейки использовались стаканчики из кварцевого стекла объемом 20 см<sup>3</sup>, устанавливаемые на платформу анализатора, находящуюся в специализированное отверстие.

В работе использовали мерную лабораторную стеклянную посуду: конические колбы наливные вместимостью 25.0, 50.0, 100.0 и 1000.0 см<sup>3</sup>; цилиндры мерные вместимостью 10.0 см<sup>3</sup>.

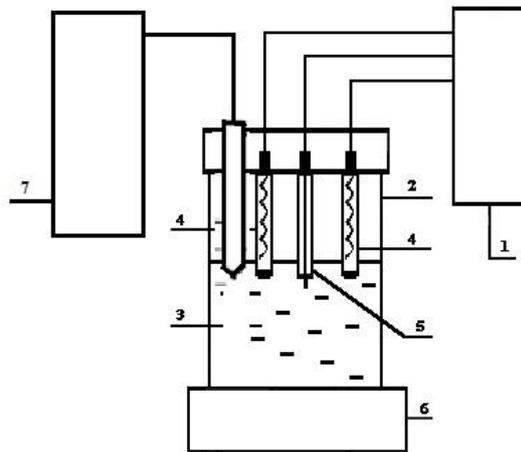
Особое значение отводилось чистоте посуды. Сменные стаканчики из стекла отмывали концентрированной азотной кислотой с последующим кипячением в течение 10-15 мин на плитке с закрытой спиралью. Чистоту проверяли методом вольтамперометрии. Перед началом каждой серии

опытов снимали «холостой» опыт в фоновом электролите с целью контроля чистоты посуды. В случае отсутствия пиков на анодно-катодных вольтамперограммах посуда и фоновый электролит считались чистыми.

### *Электрохимическая ячейка и электроды*

В работе для проведения экспериментальных исследований использовали электрохимическую ячейку, представляющую из себя сменный стаканчик из кварцевого стекла, объемом 20 см<sup>3</sup>, устанавливаемый на платформу анализатора в специализированное отверстие; индикаторный электрод, электрод сравнения и вспомогательный электрод.

Схема экспериментальной установки представлена на рис. 2.1.



**Рисунок. 2.1.** Схема экспериментальной установки:

- |                   |                             |
|-------------------|-----------------------------|
| 1. ТА-2 или АОА;  | 2. Электрохимическая ячейка |
| 3. электролит;    | 3. ХСЭ;                     |
| 5. РПЭ или СУЭ;   | 6. Платформа.               |
| 7. Газовый баллон |                             |

В работе использовались следующие индикаторные электроды:

1. Стеклоуглеродный электрод (СУЭ). Представляет собой пластинку стеклографита, диаметром 2 мм, впаянную с медным контактным проводником в стеклянную трубочку. Площадь рабочей поверхности электрода  $S = 0.075 \text{ см}^2$ . Поверхность электрода перед работой шлифовалась на фильтре, электрод выдерживался 2 - 5 мин в этиловом спирте для удаления поверхностно-активных органических соединений (ПАОВ). СУЭ

хранился в спиртовом растворе. Следует обратить внимание, что для уменьшения ошибки эксперимента, в работе проводилась предварительная поляризация индикаторных электродов в области потенциалов:  $E = +2 - (-2)$  В, для СУЭ в течение 5-10 мин методом циклической вольтамперометрии.

2. Ртутный пленочный электрод (РПЭ) с серебряным контактом. Представлял собой проволочку, диаметром 0.7 мм и длиной 10 мм из чистого серебра, вклеенную в стеклянную трубочку с оттянутым концом, при помощи эпоксидной смолы и припаянному к медному контактному проводнику. Площадь рабочей поверхности электрода  $S = 0.157 \text{ см}^2$ . На его рабочую поверхность наносилась тонкая пленка ртути при помощи электролиза из насыщенного раствора азотнокислой закисной ртути.  $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$  или механическим путем обычным обмакиванием. Процедура амальгирования рабочей поверхности электрода повторялась при появлении незаамальгированных участков на поверхности электрода. Готовый РПЭ хранился в дистиллированной воде. Перед работой электрод протирался фильтровальной бумагой и промывался дистиллированной водой.

В качестве электрода сравнения и вспомогательного электрода в работе использовались хлоридсеребряные электроды (ХСЭ). Представлял собой полый цилиндр, заполненный насыщенным раствором хлорида калия  $\text{KCl}$  (для проведения исследований в водных средах) или насыщенным спиртовым раствором тетраэтиламмония хлорид (для проведения исследований в неводных средах), в который опущена серебряная проволочка, покрытая труднорастворимой солью хлорида серебра.

## **2.2. Объекты исследования**

*В качестве стандартных веществ использовались:*

- коэнзим  $\text{Q}_{10}$  (Sigma-Aldrich, Германия);
- аскорбиновая кислота (Sigma-Aldrich, Германия);
- гиалуроновая кислота (Sigma-Aldrich, Германия);
- витамин  $\text{B}_1$  (Шаньдун Шэнлу Фармасьютикал Ко., Лтд, Китай)

- этиловый спирт (Лабтех, Россия);
- гексан (НПК «Криохром», Россия);
- хлорид калия (ОАО «Уралкалий», Россия);
- натрий хлорнокислый (Merck, Германия);
- ртуть (I) азотнокислая-2-водная («Лабтех», Россия);
- азотная кислота («Вектон», Россия);
- ацетонитрил (Компонент-Реактив, Россия);
- перхлорат натрия (Merck, Германия).

*В качестве объектов исследования использовались:*

- БАД «Кудесан капли для приема внутрь 3%» (АКВИОН, Россия) № ЛСР-003092/10, 2010-04-12;
- БАД «Кудесан форте раствор» (АКВИОН, Россия) Патент РФ № 2290176;

Основным активным компонентом препаратов «Кудесан» и «Кудесан форте раствор» помимо коэнзима Q<sub>10</sub> является токоферол ацетат. Содержание активных и вспомогательных веществ и их количественный состав в исследуемых БАД, представлен в таблице 2.1.

Таблица 2.1.

Состав БАД «Кудесан раствор», «Кудесан форте раствор»

	«Кудесан» капли	«Кудесан форте» раствор
Активные компоненты	Коэнзим Q <sub>10</sub> 30 мг/мл Токоферола ацетат 4,5 мг/мл	Коэнзим Q <sub>10</sub> - 60 мг/мл Токоферола ацетат - 6,8 мг/мл
Вспомогательные вещества	Вода очищенная Кремофор Бензоат натрия Лимонная кислота Аскорбил- пальмитат	Вода очищенная Макрогол глицерилгидроксистеарат Натрия бензоат Кислота лимонная Аскорбил пальмит

Так же объектами исследования были кремы косметические, содержащие коэнзим Q<sub>10</sub>:

- крем «Тайм Эксперт Коэнзим Q<sub>10</sub> форте» (ЗАО «Эвалар», Россия);
- крем для рук антивозрастной «Nivea Q<sub>10</sub> plus» (BeiersdorfAG, Германия).
- Дневной крем против морщин Eveline Cosmetics (Eveline Cosmetics, Poland).
- Омолаживающий крем с коэнзимом Q<sub>10</sub> Declare AgeControl (Declare, Switzerland).

Качественный состав и активные компоненты исследуемых кремов приведен ниже в таблице 2.2.

Таблица 2.2.

Качественный состав и активные компоненты кремов

	Крем для лица Тайм Эксперт Коэнзим Q <sub>10</sub> форте	Крем для рук антивозрастной NiveaQ <sub>10</sub> plus	Дневной крем против морщин EvelineCosmetics	Declare AgeControl омолаживающий крем с коэнзимом Q <sub>10</sub>
Активные компоненты	Коэнзим Q <sub>10</sub> Гиалуроновая кислота Витамины А, Е, F Фруктовые кислоты Д-пантенол Аллантоин	Коэнзим Q <sub>10</sub> Стеариновая кислота Креатин Диметикон Октокрилен	Коэнзим Q <sub>10</sub> Гиалуроновая кислота Масло Арганы Витамины А, Е, F, С	Коэнзим Q <sub>10</sub> Трипептид меди Витамин Е Пантенол Аллантоин Церамиды
Вспомогательные вещества	Вода Масло соевое Глицерин Спирт этиловый Лецитин Триэтаноламин Эмульгатор Т-8 Карбопол	Вода Глицерин Спирт цетиловый Стеариловый спирт Изопропиловый спирт Диметикон	Вода Водоросли ламинария Глицерин	Вода Глицерин Спирт этиловый Масло абрикосовых косточек

*Приготовление фоновых и исследуемых растворов*

Для приготовления фосфатного буферного раствора с рН 4.8 брали 0,35 см<sup>3</sup> раствора № 7 (для приготовления раствора № 7 навеску гидрофосфата натрия (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) массой 11.866 г, взвешанную с погрешностью не более 0.0002 г, переносили в мерную колбу объемом 1 дм<sup>3</sup> и доводили до

метки дистиллированной водой), переносили в мерную колбу на 100 см<sup>3</sup> и доводили до метки раствором № 6 (для приготовления раствора № 6 навеску дигидрофосфата калия (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) массой 9.073 г, взвешанную с погрешностью не более 0.0002 г, переносили в мерную колбу объемом 1 дм<sup>3</sup> и доводили до метки дистиллированной водой).

Для приготовления фосфатного буферного раствора с рН 6.86 брали 52.8 см<sup>3</sup> раствора № 7, переносили в мерную колбу объемом 100 см<sup>3</sup> и доводили до метки раствором № 6.

Для приготовления фосфатного буферного раствора с рН 8.0 брали 96.9 см<sup>3</sup> раствора № 7, переносили в мерную колбу объемом 100 см<sup>3</sup> и доводили до метки раствором № 6.

Для приготовления 0.1 М растворов перхлората натрия в этиловом спирте (безводном ацетонитриле) брали навеску перхлората натрия массой 12.5 г, взвешанную с погрешностью не более 0.0002 г, переносили в мерную колбу объемом 1 дм<sup>3</sup> и доводили до метки этиловым спиртом (безводным ацетонитрилом).

#### *Вольтамперометрическое определение*

Для вольтамперометрического определения раствор стандартного вещества коэнзима Q<sub>10</sub> готовился путем растворения навески этого вещества, взвешенной с погрешностью не более 0,0002 г., в этиловом спирте с последующим нагреванием до температуры не превышающей 35<sup>0</sup>С. Более низкие концентрации получались последовательным разбавлением этих растворов. Растворы коэнзима Q<sub>10</sub> готовились непосредственно перед работой.

#### *Экстракция*

Для исследования содержания коэнзима Q<sub>10</sub> в коммерческих образцах необходимую навеску исследуемого образца помещали в мерную колбу объемом 50 см<sup>3</sup>, добавляли 50 см<sup>3</sup> 96 % этилового спирта, нагревали до температуры, не превышающей 35<sup>0</sup>С, затем, полученный раствор

центрифугировали в течении 20 минут при скорости 4500 об×мин. Далее полученный экстракт анализировался вольтамперометрическим методом.

#### *Спектрофотометрическое определение*

При спектрофотометрическом определении навеску стандартного вещества коэнзима  $Q_{10}$ , взвешенной с погрешностью не более 0,0002 г., растворяли в гексане. Более низкие концентрации получались последовательным разбавлением этих растворов. Растворы готовились непосредственно перед работой.

#### *Экстракция*

Для исследования содержания коэнзима  $Q_{10}$  в коммерческих образцах необходимую навеску исследуемого образца помещали в мерную колбу объемом 50 см<sup>3</sup>, добавляли 25 см<sup>3</sup> гексана, для удаления мешающего влияния водорастворимых компонентов, добавляли 25 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды, оставляли на час в темном месте, затем содержимое колбы переносили в делительную воронку, интенсивно перемешивали, отстаивали и отделяли органический слой. Затем органический слой дважды отфильтровывался через фильтровальную бумагу. Далее органический слой был исследован спектрофотометрическим методом.

### **2.3. Методика эксперимента**

#### *Вольтамперометрический метод определения коэнзима $Q_{10}$*

В электрохимическую ячейку, представляющую собой стеклянный стаканчик, помещали раствор фонового электролита объемом 10 см<sup>3</sup>. В качестве фонового электролита использовался фосфатный буферный раствор с рН 6.86. Трехэлектродная ячейка состояла из индикаторного СУЭ, в качестве электродов сравнения и вспомогательного использовали ХСЭ. Электроды опускали в раствор фонового электролита и подключали к анализатору ТА-2. Использовали постоянно-токовый режим анодной вольтамперометрии, скорость развертки потенциала  $W = 100$  мВ/сек, рабочий диапазон потенциалов от -1.2 до 1.2 В, время накопления вещества на

электроде 60 сек., потенциал накопления -1.2 В, время успокоения 40 сек. Далее проводили съемку вольтамперограмм фонового электролита не менее трех раз. После получения доказательств отсутствия загрязнений в фоновом растворе и воспроизводимой фоновой кривой переходили к работе с исследуемым веществом.

Количественно дозатором вносили определенный объем исследуемого раствора и проводили съемку вольтамперограмм в соответствии с последовательностью описанной выше.

Для удаления мешающего влияния кислорода перед каждым экспериментом через раствор в течении 10 минут пропускали азот под давлением.

*Вольтамперометрический метод определения антиоксидантной активности коэнзима  $Q_{10}$*

В электрохимическую ячейку помещали 10 см<sup>3</sup> 0.1 М спиртового раствора перхлората натрия. Трехэлектродная химическая ячейка состояла из индикаторного РПЭ и ХСЭ использовали в качестве электродов сравнения и вспомогательного. Электроды опускали в раствор фонового электролита и подключали к анализатору АОА. Использовался постоянноточковый режим катодной вольтамперометрии, скорость развертки потенциала составляла  $W=60$  мВ/с, рабочий диапазон потенциалов от 0 до -1.2 В. Перемешивали раствор с помощью вибрации индикаторного электрода в течение 20 сек., затем 10 сек. осуществляли успокоение раствора. Далее снимали первую волну катодного восстановления кислорода, растворенного в фоновом растворителе, в указанной области потенциалов. Повторяли съемку вольтамперограммы не менее пяти раз. Делали добавку приготовленного раствора исследуемого вещества, каждый раз снимая вольтамперограммы первой волны катодного восстановления кислорода. Для оценки антиоксидантной активности исследуемых веществ строили зависимости

относительного изменения предельного тока ЭВ  $O_2$  от времени взаимодействия вещества с активными кислородными радикалами:

$$\left(1 - \frac{I_i}{I_o}\right) = f(t)$$

Степень уменьшения тока электровосстановления  $O_2$  являлась показателем антиоксидантной активности исследуемых веществ. По тангенсу угла наклона полученных зависимостей определяли коэффициенты антиоксидантной активности коэнзима  $Q_{10}$  (мкмоль/л·мин):

$$K = \left(1 - \frac{I_i}{I_o}\right) \cdot \frac{C_{O_2}^o}{t}$$

где,  $I_i$  – ток ЭВ  $O_2$  в присутствии АО в растворе, мкА;

$I_o$  – ток ЭВ  $O_2$  в отсутствии АО в растворе, мкА;

$C_{O_2}^o$  - исходная концентрация кислорода в растворе, мкмоль/л;

$t$  – время протекания реакции взаимодействия антиоксиданта с активными кислородными радикалами, мин.

#### *Спектрофотометрическое определение коэнзима $Q_{10}$*

Спектрофотометрическая методика определения коэнзима  $Q_{10}$  основана на его способности генерировать спектр поглощения при длине волны  $\lambda = 275$  нм. Основные условия проведения эксперимента: время интеграции 1 сек., спектральная пропускная способность канала 2 нм, шаг сканирования 0.1 сек. Все измерения осуществлялись на спектрофотометре.

#### **2.4. Статистическая обработка результатов**

В многогранной и сложной работе по обеспечению единства измерений в стране важнейшее место отводится разработке и аттестации методик измерений. Об этом достаточно наглядно свидетельствует тот факт, что в Закон Российской Федерации "Об обеспечении единства измерений" включена отдельная 9 статья, которая гласит: "Измерения должны осуществляться в соответствии с аттестованными в установленном порядке методиками выполнения измерений".

В шести стандартах ГОСТ Р ИСО 5725-2002 детально и конкретно (с примерами) изложены основные положения и определения показателей точности методов измерений и результатов измерений, способы экспериментальной оценки показателей точности и использования значений точности на практике. Следует обратить внимание на представленную в стандарте ГОСТ Р ИСО 5725 новую терминологию.

В соответствии с ГОСТ Р 5725-1-2002 - 5725-6-2002 в описании точности КХА используется три термина: прецизионность, правильность и точность.

Прецизионность - степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных установленных условиях. Эта характеристика зависит только от случайных факторов и не связана с истинным значением или принятым опорным значением.

Правильность - характеризует степень близости среднего значения, полученного на основании большой серии результатов измерений к истинному или в случае его отсутствия к принятому опорному значению. Показателем правильности обычно является значение систематической погрешности.

Точность - степень близости результата анализа к истинному или принятому опорному значению.

Опорное значение - значение, которое служит в качестве согласованного. В качестве опорного значения может быть принято:

- теоретическое или научно установленное значение;
- аттестованное значение СО;
- аттестованное значение смеси (АС);
- математическое ожидание измеряемой характеристики, т.е. среднее значение заданной совокупности результатов анализа.

На изменчивость результата химического анализа могут оказывать различные факторы: время (интервал времени между измерениями), калибровка, оператор, оборудование, параметры окружающей среды.

В зависимости от влияющих факторов прецизионность результатов анализа включает:

- прецизионность анализа в условиях повторяемости - условия при которых результаты анализа получают по одной и той же методике в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования, практически одновременно (параллельные определения);

- прецизионность анализа в условиях воспроизводимости - условия при которых результаты анализа получают по одной и той же методике в разных лабораториях, варьируя различными факторами (разное время, оператор, условия окружающей среды);

- внутрилабораторную прецизионность анализа - условия при которых результаты анализа получают по одной и той же методике в одной и той же лаборатории при вариации различных факторов (время, оператор, разные партии реактивов и т.д.).

Мерой оценки прецизионности является среднеквадратическое отклонение (СКО):

$\sigma_T$  - СКО повторяемости;

$\sigma_R$  - СКО воспроизводимости;

$\sigma_{Rл}$  - СКО внутрилабораторной прецизионности).

### ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ - ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОЭНЗИМА Q<sub>10</sub> НА СТЕКЛОУГЛЕРОДНОМ ЭЛЕКТРОДЕ.

В клеточных мембранах биологических тканей имеются собственные липофильные (жирорастворимые) антиоксиданты: это прежде всего коэнзим Q<sub>10</sub> и витамин Е (сочетанные формы токоферола). Коэнзимы (иначе говоря – коферменты) представляют собой органические соединения небелковой природы, необходимые для осуществления каталитического действия многих ферментов. Соединяясь с белковой частью молекулы фермента – апоферментом, коферменты образуют каталитически активный комплекс.

Коэнзим Q<sub>10</sub> обладает характерными окислительно-восстановительными свойствами хинонов. Окисление (восстановление) хинолов (хинонов) происходит в два шага, когда один ион водорода начинает отделяться от хинола (присоединяться к хинону) с образованием относительно стабильного радикала, который называется семихинон. И когда второй ион водорода удаляется (присоединяется) завершается процесс окисления (восстановления) хинона (хинола).

Перенос электронов в процессе окисления или восстановления коэнзима Q<sub>10</sub> может быть использован для его количественного определения электрохимическими методами.

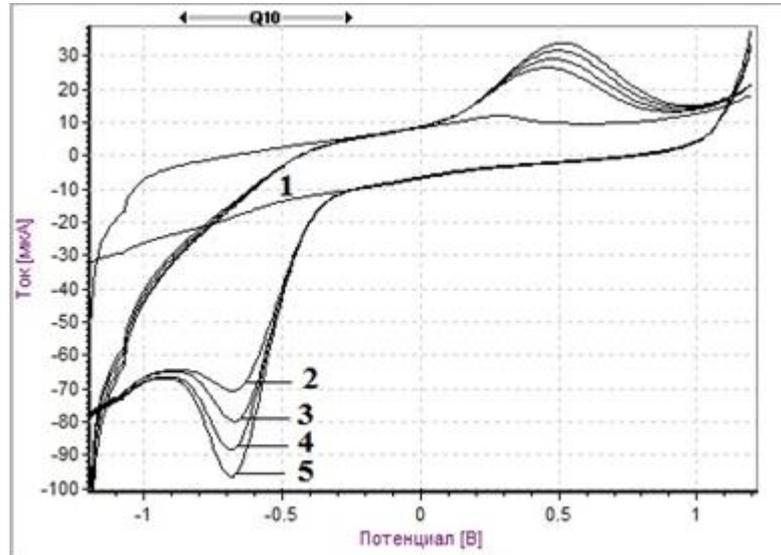
#### *3.1. Влияние различных факторов на аналитический сигнал коэнзима Q<sub>10</sub>*

Для оценки оптимальных условий получения аналитического сигнала коэнзима Q<sub>10</sub> исследовали влияние ряда факторов: материала индикаторного электрода, природа фонового электролита и рН раствора, а также время и потенциал электролиза, скорость развертки потенциала.

### 3.1.1. Влияние материала индикаторного электрода на аналитический сигнал коэнзима $Q_{10}$

В ходе эксперимента для поиска оптимальных условий определения коэнзима  $Q_{10}$  в косметических и фармацевтических препаратах использовали два вида индикаторных электродов: РПЭ и СУЭ. В качестве вспомогательного электрода и электрода сравнения использовали хлорид-серебрянные электроды. В качестве фонового электролита использовали фосфатный буферный раствор с рН 6,86. В качестве метода исследования применяли циклическую постоянноточковую вольтамперометрию. Условия съемки: область потенциалов для РПЭ от  $E = 0.0$  до  $-2$  В, для СУЭ  $E =$  от  $-2$  до  $2$  В.

При исследовании электрохимических свойств коэнзима  $Q_{10}$  аналитический сигнал на СУЭ был получен в области потенциалов  $E = -1.2$  до  $1.2$  В. При этом потенциал окисления  $CoQ_{10}$  составил  $E = 0.5$  В, потенциал его восстановления  $E = -0.6$  В (рис. 3.1).



**Рисунок 3.1.** Циклические вольтамперограммы коэнзима  $Q_{10}$  на СУЭ в фосфатном буфере (рН 6.86) (1) при разных значениях концентрации  $CoQ_{10}$  в электрохимической ячейке: 10 (2), 20 (3), 30 (4), 40 (5)  $\mu\text{M}$   $CoQ_{10}$ . Скорость развертки потенциала  $100 \text{ мВ} \cdot \text{с}^{-1}$ .

В данных условиях в области развертки потенциалов от 0.0 до -2.0 В при постоянноточковой развертке потенциала электрохимический сигнал коэнзима  $Q_{10}$  на РПЭ не был найден. Однако, из литературных данных известен метод определения коэнзима  $Q_{10}$  на ртутно-капающем электроде. Авторами Гордилло и Шиффрин был предложен метод определения коэнзима  $Q_{10}$  на ртутно-капающем электроде, в качестве электрода сравнения был использован каломельный электрод, вспомогательного – платиновый. Исходный раствор коэнзима  $Q_{10}$  был приготовлен из синтетического коэнзима, растворенного в пентане. В качестве фонового электролита был выбран раствор буры и солей  $K_2HPO_4$  и  $KH_2PO_4$ , pH раствора 9.2. Электрохимический сигнал коэнзима был получен при постоянноточковой развертке потенциала в области  $E =$  от 0.0 до -0.5 В.

Таким образом, для дальнейшего определения коэнзима  $Q_{10}$  и создания методики его определения выбрали нетоксичный и более чувствительный по сравнению с РПЭ стеклоуглеродный электрод.

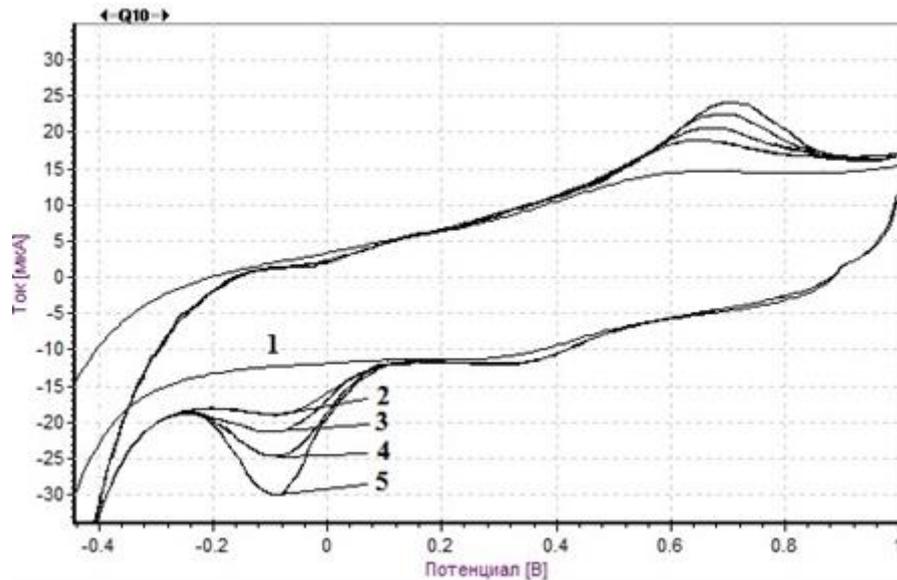
### ***3.1.2. Влияние природы фонового электролита на аналитический сигнал коэнзима $Q_{10}$***

Для исследования влияния природы фонового электролита на аналитический сигнал коэнзима  $Q_{10}$  были выбраны водные и апротонные среды.

Для исследования электрохимических свойств коэнзима  $Q_{10}$  в водных средах использовали фосфатный буферный раствор с pH 6,86. В качестве индикаторного электрода использовался СУЭ, в качестве электрода сравнения и вспомогательного – хлорсеребряные. Как уже говорилось ранее, в данных условиях были получены устойчивые и воспроизводимые аналитические сигналы коэнзима  $Q_{10}$  (рис. 3.1).

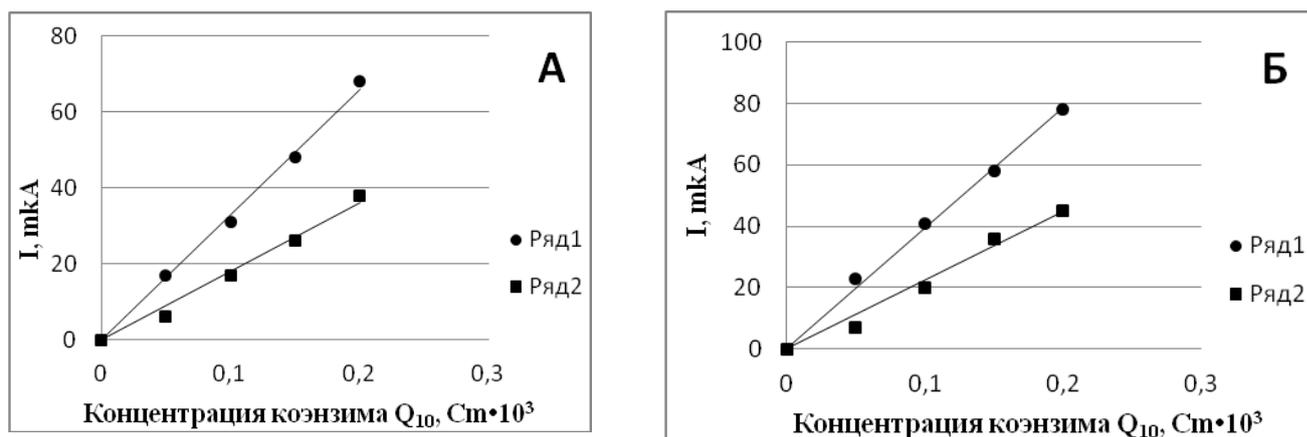
Для исследования электрохимического поведения коэнзима  $Q_{10}$  в апротонных средах был выбран безводный ацетонитрил. В качестве фонового электролита использовалась соль перхлората натрия  $NaClO_4$  (0.1 М

раствор), индикаторный электрод – СУЭ, в качестве электрода сравнения и вспомогательного использовались ХСЭ и платиновый, соответственно. В результате работы получили циклическую вольтамперограмму окисления-восстановления коэнзима  $Q_{10}$  в безводном ацетонитриле на СУЭ (рис. 3.2). Пики окисления и восстановления убихинона находились в области потенциалов  $E_a = 0.7$  В,  $E_k = -0.1$  В, соответственно.



**Рисунок 3.2.** Циклические вольтамперограммы коэнзима  $Q_{10}$  на СУЭ в безводном ацетонитриле ( $0.1$  М  $NaClO_4$ ) (1) при разных значениях концентрации  $CoQ_{10}$  в электрохимической ячейке:  $10$  (2),  $20$  (3),  $30$  (4),  $40$  (5)  $\mu$ М  $CoQ_{10}$ . Скорость развертки потенциала  $100$  мВ $\cdot$ с $^{-1}$ .

Аналитический сигнал коэнзима  $Q_{10}$  в апротонных средах оказался плохо выраженным и нестабильным. С течением времени пики окисления и восстановления коэнзима  $Q_{10}$  изменяли свою форму и уменьшались. Предположительно это связано с тем, что присутствующие в фоновом растворе перхлорат ионы являются очень сильными окислителями, тем самым снижая устойчивость компонентов системы. Также, токи электровосстановления и электроокисления коэнзима  $Q_{10}$  в апротонных средах оказались значительно ниже, чем в водных (рис. 3.3).



**Рисунок 3.3.** Зависимость предельного тока восстановления (А) и окисления (Б) в зависимости от природы фонового электролита (1 – фосфатный буферный раствор рН 6.86; 2 – безводный ацетонитрил (0.1 М раствор NaClO<sub>4</sub>)).

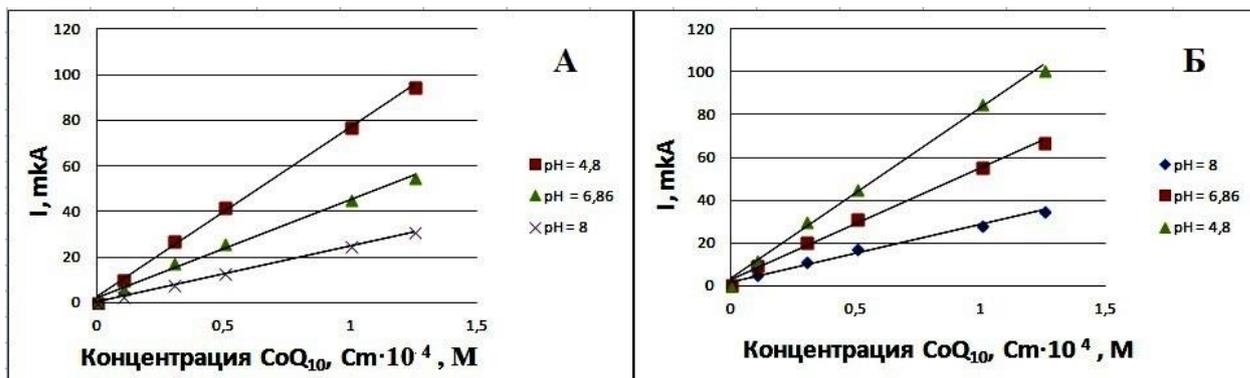
В дальнейшем, для создания вольтамперометрической методики определения коэнзима Q<sub>10</sub> в косметических и фармацевтических препаратах, принято использовать водные буферные растворы для стабилизации аналитического сигнала, улучшения его воспроизводимости, а также для увеличения чувствительности разрабатываемой методики.

### ***3.1.3. Влияние рН фонового электролита на аналитический сигнал коэнзима Q<sub>10</sub>***

В связи с участием протонов в электрохимической реакции, дальнейшим этапом в исследованиях стало изучение влияния рН фоновых электролитов на процесс окисления и восстановления коэнзима Q<sub>10</sub> на СУЭ.

Для определения оптимального фонового электролита для аналитического определения коэнзима Q<sub>10</sub> готовили фоновые буферные растворы со следующими значениями рН: 4.80, 6.86, 8.0. Эксперимент проводился в условиях постоянноточковой вольтамперометрии. В качестве индикаторного электрода использовали СУЭ.

Влияние рН фонового электролита на электрохимический сигнал окисления-восстановления коэнзима  $Q_{10}$  приведено на рисунке 3.4.



**Рисунок 3.4.** Зависимость предельного тока окисления (А) и восстановления (Б) коэнзима  $Q_{10}$  от его концентрации на СУЭ при разных значениях рН среды.

Из рисунка 3.4 видно, что при увеличении кислотности среды анодный ток окисления увеличивается, а катодный ток восстановления уменьшается. Предполагается, что в кислой среде происходит протонизация молекулы коэнзима  $Q_{10}$ , что облегчает его окисление. В щелочной среде наблюдается увеличение тока восстановления коэнзима  $Q_{10}$  вследствие полной диссоциации гидроксилной группы (-ОН) гидрохинонной части молекулы коэнзима  $Q_{10}$ , и как следствие облегчение процесса восстановления.

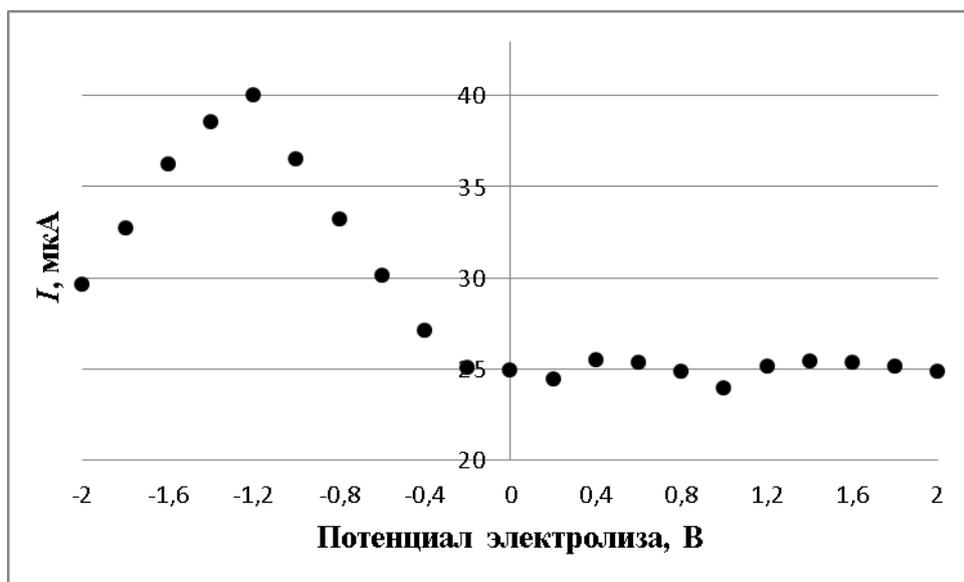
Из литературных источников известно, что молекула коэнзима  $Q_{10}$  чувствительна к физико-химическим воздействиям, например, в щелочной и кислой среде и под действием света она становится нестабильна и начинает самопроизвольно трансформироваться. Поэтому, для создания методики использовали в качестве фонового электролита фосфатный буферный раствор с рН 6.86. Это обусловлено стабильностью молекулы коэнзима  $Q_{10}$  в водных нейтральных средах. В качестве индикаторного электрода рекомендовали использовать СУЭ.

Получив катодный и анодный пики восстановления и окисления коэнзима  $Q_{10}$ , пришли к выводу о целесообразности использования метода анодной вольтамперометрии.

### 3.1.4. Влияние параметров электролиза (время и потенциал электролиза) на аналитический сигнал коэнзима $Q_{10}$

Для достижения поставленной цели подобрали условия электролиза на модельном растворе коэнзима  $Q_{10}$  (время и потенциал электролиза, а также границы развертки потенциала).

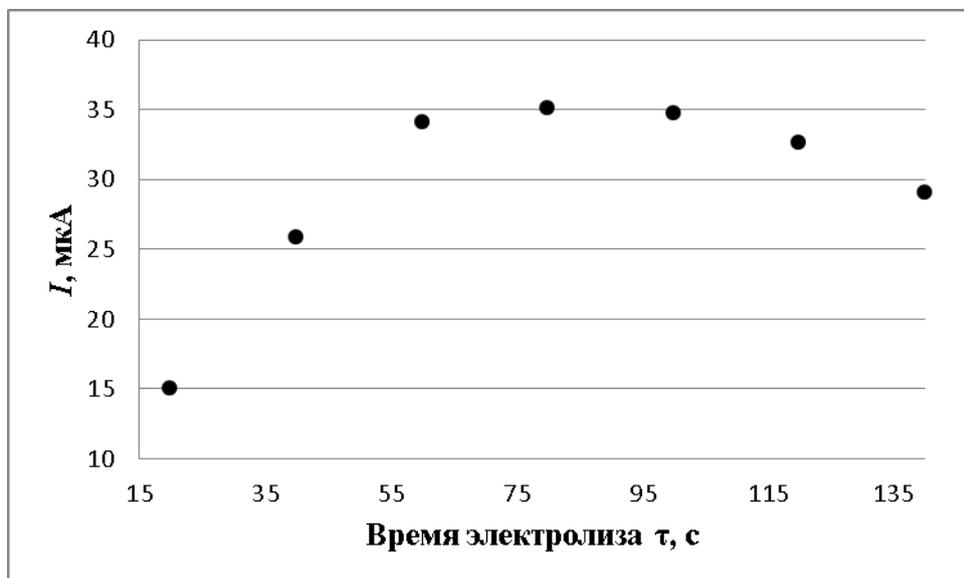
Определяющим фактором при разработке вольтамперометрической методики определения является потенциал накопления, который должен способствовать максимально полному выделению исследуемого вещества без мешающего влияния других ионов. При подборе потенциала накопления исследовали область значений от -2 В до 2 В. Экспериментальным путем было установлено значение данного параметра, составляющее -1.2 В. Смещение потенциала электролиза в более положительную или более отрицательную область приводило к уменьшению величины регистрируемого тока (рис. 3.5).



**Рисунок 3.5.** График зависимости высоты аналитического сигнала окисления коэнзима  $Q_{10}$  от потенциала электролиза в фосфатном буферном растворе pH 6.86 на СУЭ. Концентрация стандартного образца коэнзима  $Q_{10}$  в электролитической ячейке  $2.8 \cdot 10^{-4}$  М.

Для определения времени электролиза, с целью получения более выраженного сигнала исследовали область значений от 20 до 140 с.

Поскольку зависимость в области от 20 до 60 секунд носила линейный характер, а в области от 60 до 140 секунд наблюдалось пологое снижение высоты аналитического сигнала, выбор остановили на времени накопления 60 секунд (рис. 3.6).



**Рисунок 3.6.** График зависимости высоты аналитического сигнала окисления коэнзима  $Q_{10}$  от времени накопления в фосфатном буферном растворе на СУЭ. Концентрация стандартного образца коэнзима  $Q_{10}$  в электролитической ячейке  $2.8 \cdot 10^{-4}$  М.

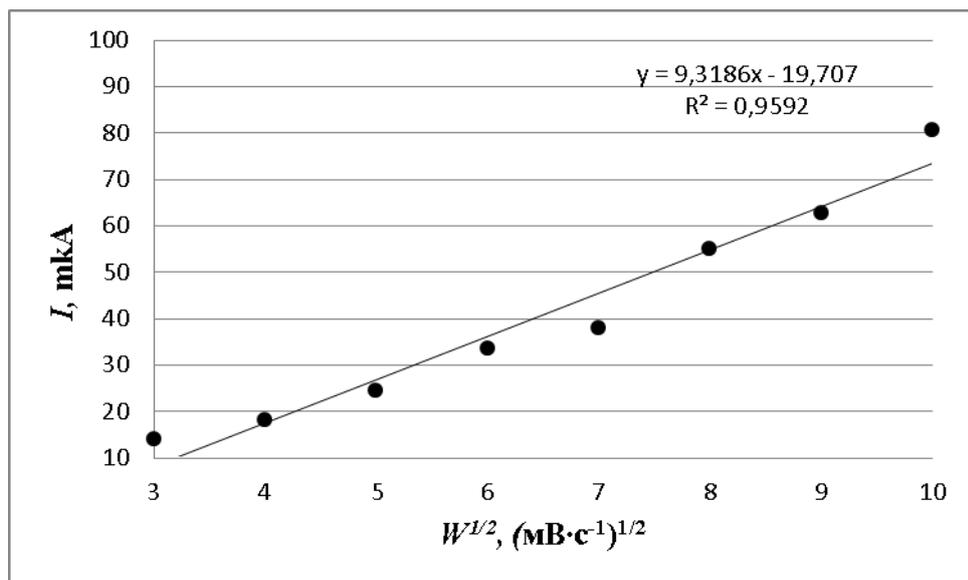
Границу развертки потенциала установили при постоянстве начального потенциала  $-1.2$  В, соответствующего потенциалу электролиза, при этом значение верхней границы развертки потенциала составило  $1.2$  В. Изменение данного значения в более положительную область приводило к размыванию пика, что затрудняло обработку результата. Таким образом, оптимальная область развертки потенциала соответствовала значениям от  $-1.2$  В до  $1.2$  В.

В данной главе были подобраны условия определения коэнзима  $Q_{10}$  вольтамперометрической методикой. В качестве фонового электролита использовали фосфатный буферный раствор с рН 6.86, в качестве индикаторного электрода – СУЭ, в качестве электрода сравнения и вспомогательного – ХСЭ. Использовали постоянно-токовый режим анодной вольтамперометрии, скорость развертки потенциала  $W = 100$  мВ/сек, рабочий

диапазон потенциалов от -1.2 до 1.2 В, время накопления вещества на электроде 60 сек., потенциал накопления -1.2 В, время успокоения - 40 сек.

### 3.2. Исследование физико-химических закономерностей протекания реакции окисления-восстановления коэнзима $Q_{10}$ на стеклоуглеродном электроде

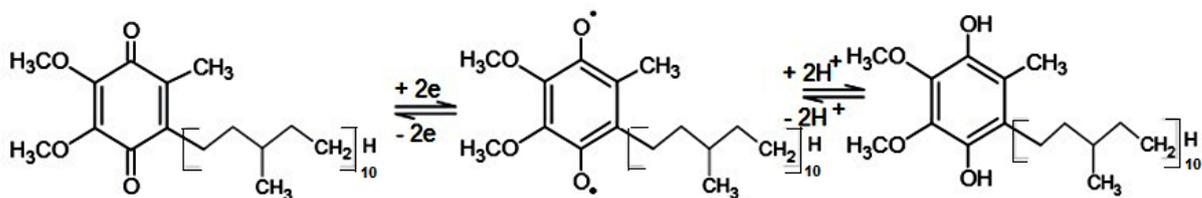
Для описания механизма электровосстановления коэнзима  $Q_{10}$  на СУЭ в водных нейтральных средах исследовали обратимость этого процесса [130]. В вольтамперометрии одним из критериев обратимости процессов является линейная зависимость тока от  $W^{1/2}$  для обратимых и необратимых процессов, кроме квазиобратимого процесса. Для исследования обратимости электрохимического сигнала восстановления коэнзима  $Q_{10}$  была снята зависимость тока электровосстановления коэнзима  $Q_{10}$  от  $W^{1/2}$  (рис. 3.7).



**Рисунок 3.7.** График зависимости высоты тока восстановления  $\text{CoQ}_{10}$  от скорости развертки потенциала в степени  $1/2$  в фосфатном буферном растворе на СУЭ. Концентрация  $\text{CoQ}_{10}$   $5 \cdot 10^{-5}$  М.

Представленная на рисунке 3.7 зависимость  $I=f(W^{1/2})$  имеет нелинейный характер, что указывает на квазиобратимость электрохимического сигнала восстановления коэнзима  $Q_{10}$  на СУЭ.

На основании проведенных исследований предположили механизм окисления-восстановления коэнзима  $Q_{10}$  на СУЭ в водных нейтральных средах:



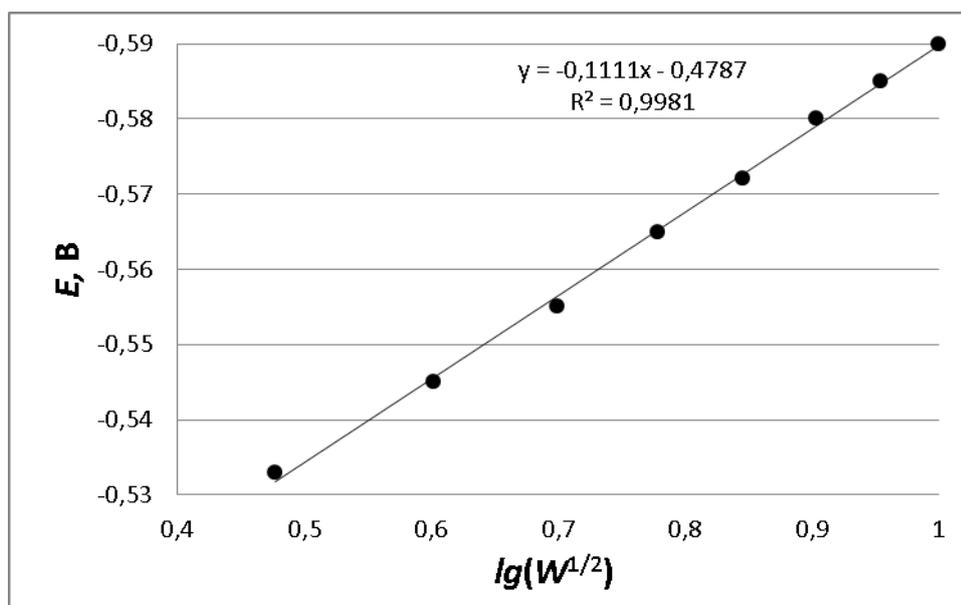
Как видно из схемы протекания процесса, при восстановлении коэнзима  $Q_{10}$ , электродный процесс сопровождается наличием последующей химической реакции.

Точное решение для вольтамперометрического процесса с последующей химической реакцией дали в 1964 году Никольсон и Шейн. Решение, полученное Никольсоном и Шейном, касается как обратимой, так и необратимой последующей химической реакции. В последующих работах были выявлены и обобщены признаки наличия последующей реакции в электродном процессе по механизму ЕС:

1. Линейная зависимость потенциала пика от логарифма  $W^{1/2}$  (в случае обратимых и квазиобратимых процессов) и при увеличении  $1/W$  (в случае необратимых процессов);

2. Сдвиг потенциала в область положительных значений при увеличении концентрации вещества, взаимодействующего с деполяризатором, или при уменьшении скорости развертки потенциала.

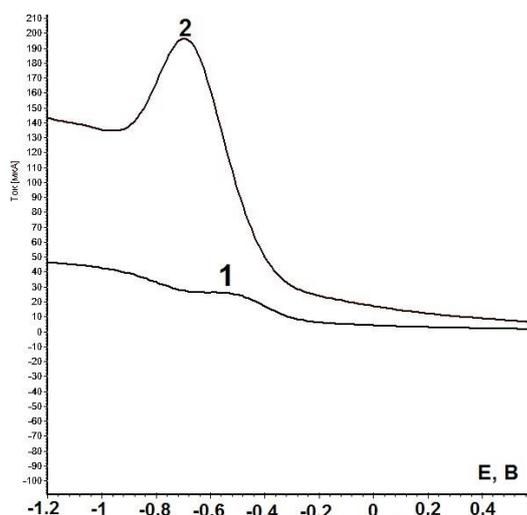
В данной работе показано, что для процесса электровосстановления коэнзима  $Q_{10}$  на СУЭ данные критерии соблюдаются. Зависимость  $E = \lg(W^{1/2})$  носит линейный характер (рис. 3.8).



**Рисунок 3.8.** График зависимости потенциала предельного тока электровосстановления коэнзима  $Q_{10}$  от логарифма скорости развертки потенциала в степени  $1/2$

Еще одним из доказательств наличия последующей химической реакции является сдвиг потенциала пика вещества в сторону положительных значений при уменьшении скорости развертки потенциала.

На рисунке 3.9 представлена вольтамперограмма тока ЭВ  $CoQ_{10}$  в водной нейтральной среде на СУЭ при  $W = 30$  и  $300$  мВ/сек.



**Рисунок 3.9.** Вольтамперограммы тока электровосстановления коэнзима  $Q_{10}$  на СУЭ в фосфатном буферном растворе ( $pH = 6.86$ ) ( $C_m (CoQ_{10}) = 0.9 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ ) при скорости развертки  $30$  мВ/сек (1) и  $300$  мВ/сек (2).

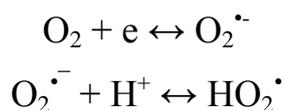
Из представленной вольтамперограммы видно, что при уменьшении скорости развертки потенциала наблюдается сдвиг потенциала катодной волны электровосстановления коэнзима  $Q_{10}$  в положительную область, а также уменьшение предельного тока электровосстановления коэнзима  $Q_{10}$ .

Таким образом, в данной главе исследованы закономерности восстановления коэнзима  $Q_{10}$  на СУЭ. Показано, что на поверхности электрода идет квазиобратимый процесс осложненный наличием последующей химической реакции (механизм ЕС – electrochemicalchemical).

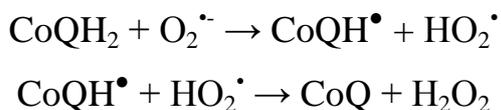
## ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ КОЭНЗИМА Q<sub>10</sub> ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Коэнзим Q<sub>10</sub> и его аналоги в организме эффективно взаимодействуют с кислородными радикалами O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, OH<sup>•</sup>, RO<sup>•</sup>, RO<sub>2</sub><sup>•</sup>. Несмотря на то, что скорость реакции убихинола CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> с перекисными радикалами жирных кислот RO<sub>2</sub><sup>•</sup> примерно на порядок меньше, чем α-токоферола [131], он выступает в качестве основного липофильного антиоксиданта в митохондриях клеток эукариот и тромбоцитах человека, в которых выявляется низкое содержание витамина С [132]. Помимо митохондрий достаточно много убихинона содержится в лизосомах, комплексе Гольджи и цитоплазматических мембранах. В митохондриях убихинон не только инактивирует липидные радикалы и тормозит процессы ПОЛ, но и защищает ДНК и белки от окислительного повреждения [133], а также ингибирует нитрование тирозиновых остатков, индуцированное пероксинитрином [134]. При этом, коэнзим Q<sub>10</sub> не только главный антиоксидант митохондрий, но и основной прооксидант [135]: окисляясь и восстанавливаясь в процессе транспорта электронов по дыхательной цепи, убихинол и его радикал могут переносить электроны на молекулярный кислород с образованием супероксид-аниона.

Для исследования антиоксидантных свойств коэнзима Q<sub>10</sub> методом вольтамперометрии, использовалась модельная реакция электровосстановления кислорода, протекающая на ртутно-пленочном электроде в области потенциалов от 0 до -1.2 В по механизму, аналогичному восстановлению кислорода в живых клетках:



При введении коэнзима Q<sub>10</sub> в электрохимическую ячейку на поверхности электрода происходила следующая реакция взаимодействия коэнзима с кислородом:



Для оценки антиоксидантной активности коэнзима Q<sub>10</sub> в зависимости от его концентрации в электрохимической ячейке, были построены зависимости относительного изменения предельного тока ЭВ O<sub>2</sub> от времени взаимодействия коэнзима Q<sub>10</sub> с активными кислородными радикалами

$$\left(1 - \frac{I_i}{I_o}\right) = f(t)$$

Степень уменьшения тока ЭВ O<sub>2</sub> являлась показателем антиоксидантной активности исследуемых веществ. По тангенсу угла наклона полученных зависимостей были определены коэффициенты антиоксидантной активности коэнзима Q<sub>10</sub> в зависимости от концентрации по кинетическому критерию  $K_{кин}$  (мкмоль/л·мин):

$$K_{кин} = \left(1 - \frac{I_i}{I_o}\right) \cdot \frac{C_{\text{O}_2}^0}{t}$$

где,

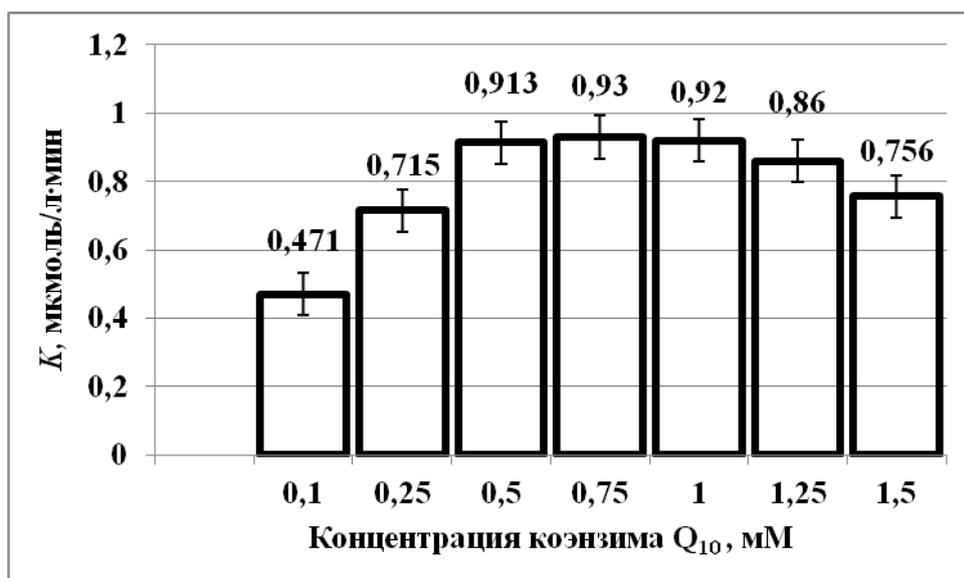
$I_i$  – ток ЭВ O<sub>2</sub> в присутствии АО в растворе, мкА;

$I_o$  – ток ЭВ O<sub>2</sub> в отсутствии АО в растворе, мкА;

$C_{\text{O}_2}^0$  - исходная концентрация кислорода в растворе, мкмоль/л;

$t$  – время протекания реакции взаимодействия антиоксиданта с активными кислородными радикалами, мин.

На рисунке 4.1 представлены результаты определения коэффициентов антиоксидантной активности коэнзима Q<sub>10</sub> в зависимости от его концентрации.



**Рисунок 4.1.** Диаграмма зависимости критерия  $K$  антиоксидантной активности коэнзима  $Q_{10}$  в зависимости от его концентрации в растворе.

Как видно из рисунка 4.1 максимальное значение коэффициента антиоксидантной активности коэнзима  $Q_{10}$  наблюдается в области концентраций от  $0,5 \cdot 10^{-3}$  до  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>. Таким образом, использование вольтамперометрического метода позволило наиболее полно исследовать антиоксидантные свойства коэнзима  $Q_{10}$ , предположить вероятный механизм взаимодействия коэнзима  $Q_{10}$  с активными формами кислорода.

## ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ НА АНАЛИТИЧЕСКИЙ СИГНАЛ КОЭНЗИМА Q<sub>10</sub>

Фармацевтические и косметические препараты, представляют собой сложную матрицу, состоящую из веществ, различной природы. В диссертации исследовали влияние на аналитический сигнал коэнзима Q<sub>10</sub> различных соединений и ионов, которые являются электрохимически активными и могут содержаться в исследуемых объектах. Концентрацию изучаемых веществ брали примерно равной концентрации этих веществ в косметических и фармацевтических препаратах.

### 5.1. Влияние витамина С на аналитический сигнал коэнзима Q<sub>10</sub>

Аскорбиновая кислота (витамин С) является лактоном, содержащим диенольную группу, которая обуславливает ее кислотные свойства. Аскорбиновая кислота является сильным восстановителем: энольные группы ее легко окисляются до кетогрупп.

Аскорбиновая кислота является одним из основных сопутствующих компонентов БАД, косметических средств, содержащих коэнзим Q<sub>10</sub>. Поэтому рассмотрение влияния аскорбиновой кислоты на аналитический сигнал коэнзима Q<sub>10</sub> является важной задачей.

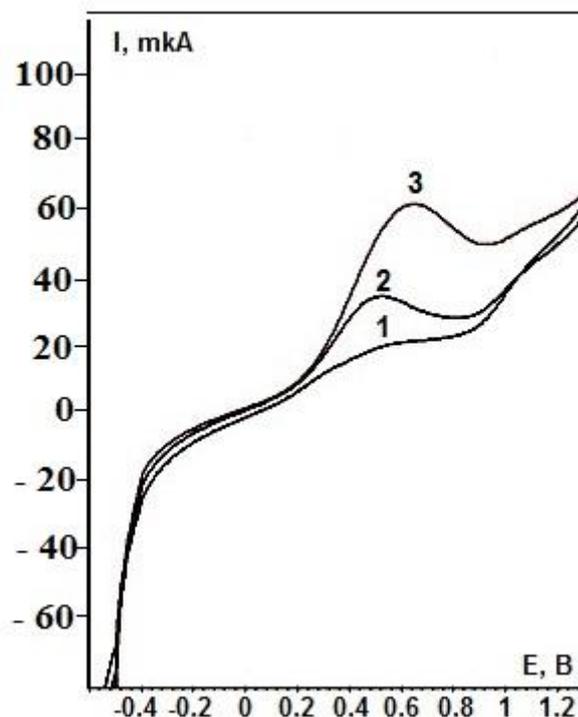
Аскорбиновая кислота является электроактивным соединением. Авторы работы [136] предложили метод определения аскорбиновой кислоты на стеклоуглеродном электроде в фоновом электролите 0.4 М буферный раствор Бриттона-Робинсона рН 1.91 в присутствии 0.1 М раствора КСl. По мнению авторов, введение 0.1 М раствора КСl обеспечивает хорошую электропроводность раствора в присутствии биологической пробы и повышает растворимость аскорбиновой кислоты в воде.

Исследования влияния аскорбиновой кислоты на аналитический сигнал электроокисления коэнзима Q<sub>10</sub> проводили в условиях постоянноточковой вольтамперометрии в области потенциалов от -0.6 до 1.2 В, скорость развертки потенциала 100 мВ/сек., в качестве фонового электролита

использовали фосфатный буферный раствор с рН 6.86. В качестве индикаторного электрода использовали СУЭ, в качестве вспомогательного электрода и электрода сравнения ХСЭ. Раствор аскорбиновой кислоты с молярной массой  $C_m=0,0012\text{г/дм}^3$ , готовили растворением соответствующей навески аскорбиновой кислоты в дистиллированной воде. Раствор коэнзима  $Q_{10}$  готовился по методике, описанной в п. 2.2 главы 2 данной работы.

При данных условиях определения аскорбиновая кислота оказалось электрохимически неактивной на СУЭ.

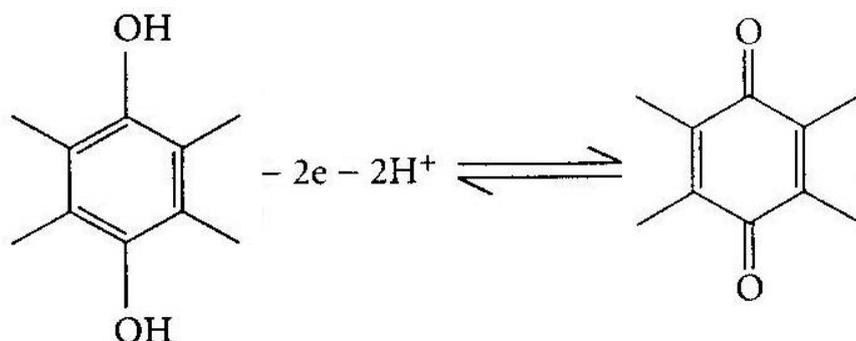
Однако, в результате наших исследований выявлено значительное влияние аскорбиновой кислоты на аналитический сигнал коэнзима  $Q_{10}$  (рис. 5.1).



**Рисунок 5.1.** Вольтамперограмма электроокисления коэнзима  $Q_{10}$  ( $C_m = 0,0012\text{ г/дм}^3$ ) -2; коэнзима  $Q_{10}$  в присутствии витамина С ( $C_m = 0,025\text{ г/дм}^3$ ) - 3 в фосфатном буферном растворе на СУЭ.

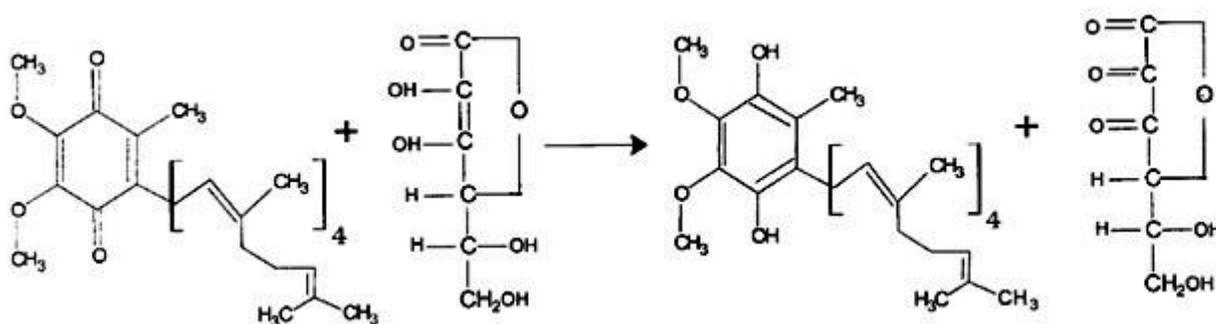
Как видно из рисунка 5.1 после введения в раствор аскорбиновой кислоты, аналитический сигнал коэнзима  $Q_{10}$  сильно возрастает. Коэнзим  $Q_{10}$  в растворе может находиться в двух состояниях: окисленном -  $CoQ_{10}$  и

восстановленном -  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ . Восстановленная форма коэнзима является неустойчивой и под воздействием внешних факторов (кислород воздуха) переходит в окисленную. В анодной области происходит процесс электроокисления коэнзима (рис. 5.2).



**Рисунок 5.2.** Процесс электроокисления коэнзима  $\text{Q}_{10}$  в водной среде на СУЭ

Аскорбиновая кислота, являясь сильным восстановителем отдает два иона водорода и тем самым восстанавливает коэнзим  $\text{Q}_{10}$  (рис. 5.3). Таким образом, увеличивая содержание восстановленной формы коэнзима  $\text{Q}_{10}$  в растворе.



**Рисунок 5.3.** Процесс восстановления коэнзима  $\text{Q}_{10}$  аскорбиновой кислотой

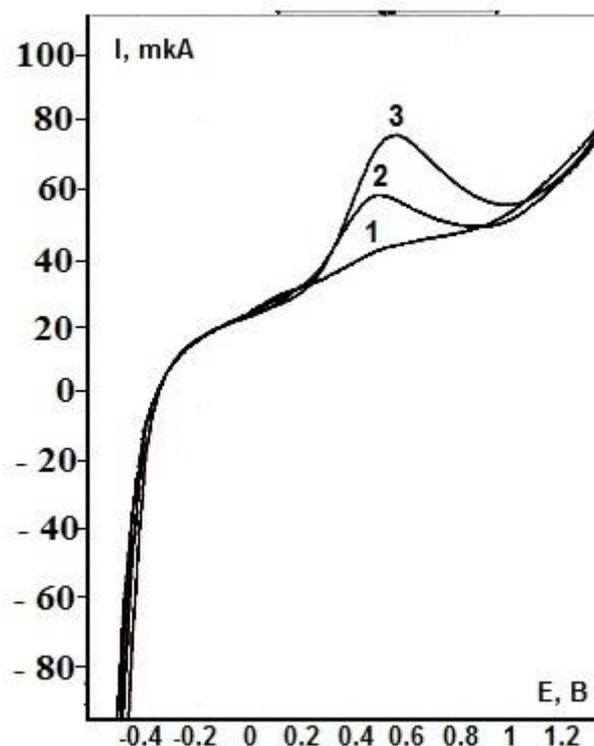
Таким образом, можно сделать вывод, о том, что увеличение сигнала электроокисления коэнзима  $\text{Q}_{10}$  в присутствии аскорбиновой кислоты свидетельствует о том, что при введении исследуемого вещества в модельный раствор коэнзима  $\text{Q}_{10}$ , происходит восстановление последнего и смещение отношения убихинон : убихинол в сторону восстановленной формы коэнзима  $\text{Q}_{10}$  (убихинола).

## 5.2. Влияние витамина В<sub>1</sub> на аналитический сигнал коэнзима Q<sub>10</sub>

В ходе дальнейших исследований так же установили значительное влияние тиамин (витамина В<sub>1</sub>) на аналитический сигнал коэнзима Q<sub>10</sub>. Эксперимент проводили в условиях постоянно-токовой вольтамперометрии. В качестве индикаторного электрода использовался СУЭ, в качестве электрода сравнения и вспомогательного ХСЭ, фоновый электролит – фосфатный буферный раствор (рН 6.86).

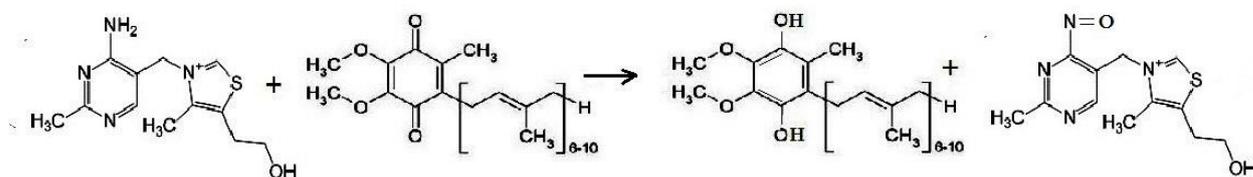
Из литературы известно, что витамин В<sub>1</sub> является электроактивным соединением. Количественное определение водорастворимых витаминов В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub> проводят методом инверсионной вольтамперометрии, при этом указанные витамины переводят из пробы в раствор и проводят вольтамперометрическое накопление витаминов В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub> в перемешиваемом растворе в течение 30 - 60с при потенциале электролиза В<sub>1</sub> - минус 0,7 - 0,9 В, В<sub>2</sub> - минус 0,4 - 0,6 В относительно насыщенного хлоридсеребряного электрода на фоновом электролите В<sub>1</sub> - 0,1 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, В<sub>2</sub> - 0,01 М HCl с последующей регистрацией анодных пиков в дифференциальном режиме съемки вольтамперограмм при скорости развертки потенциала 20 ÷ 30 мВ/с, концентрацию витаминов В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub> определяют по высоте пика в диапазоне потенциалов В<sub>1</sub> - минус 1,2-1,4 В, В<sub>2</sub> - минус 0,15-0,35 В методом добавок аттестованных смесей [137].

При вольтамперометрическом исследовании витамина В<sub>1</sub> в фосфатном буферном растворе на стеклоуглеродном электроде электрохимического сигнала получено не было. Однако, аналитический сигнал коэнзима Q<sub>10</sub> в присутствии витамина В<sub>1</sub> значительно возрастает (рис. 5.4).



**Рисунок 5.4.** Вольтамперограмма электроокисления коэнзима  $Q_{10}$  ( $C_m = 0,0012 \text{ г/дм}^3$ ) -2; коэнзима  $Q_{10}$  в присутствии витамина  $B_1$  ( $C_m = 0,065 \text{ г/дм}^3$ ) – 3 в фосфатном буферном растворе на СУЭ.

Возрастание сигнала электроокисления коэнзима  $Q_{10}$  в присутствии витамина  $B_1$  связано с тем, что в молекуле витамина  $B_1$  содержится два подвижных иона водорода в аминогруппе, которые он может отдавать, при этом окисляясь и восстанавливая коэнзим  $Q_{10}$  подобно аскорбиновой кислоте.



**Рисунок 5.5.** Предположительная схема восстановления коэнзима  $Q_{10}$  тиамином.

Таким образом, показано, что витамин  $B_1$  препятствует окислению убихинола, способствует его восстановлению, тем самым увеличивая

содержание активной формы коэнзима  $Q_{10}$  в растворах, при совместном их нахождении.

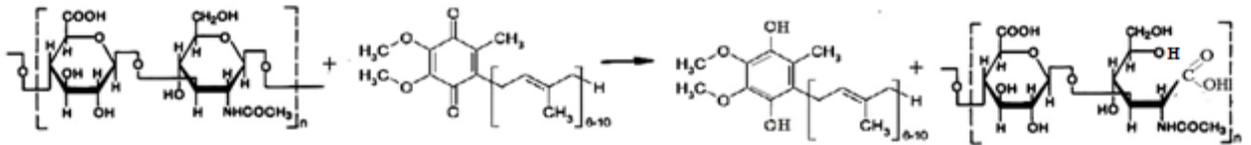
### **5.3. Влияние гиалуроновой кислоты на аналитический сигнал коэнзима $Q_{10}$**

Применение гиалуроновой кислоты и ее натриевой соли в косметике обусловлено высокой гигроскопичностью ее молекулы. В настоящее время гиалуроновая кислота и ее соли входят в состав увлажняющих кремов, губной помады и бальзамов для губ, антицеллюлитных кремов, гелей для век, лосьонов после загара, противовоспалительных лосьонов, ранозаживляющих и солнцезащитных средств.

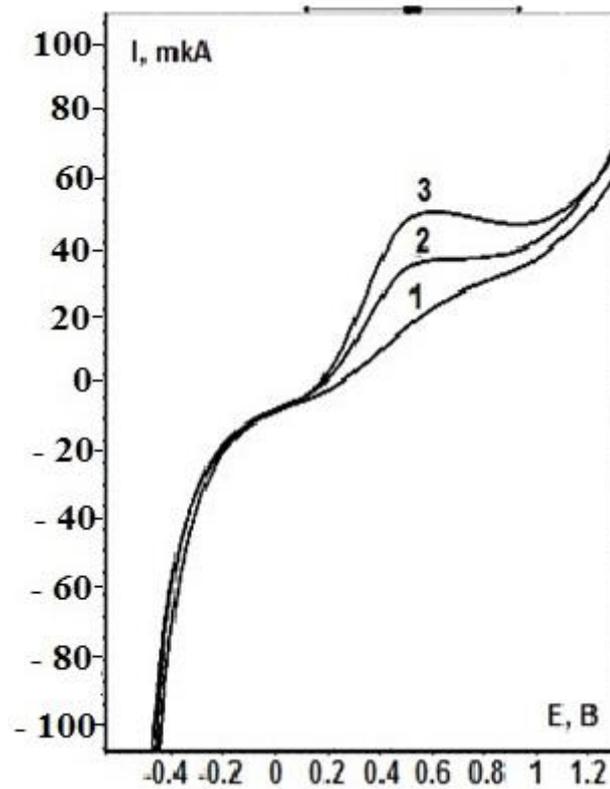
По структуре, гиалуроновая кислота – это высокомолекулярный полисахарид, состоящий из дисахаридных звеньев. Ее молекула может содержать от 12 до 25 тысяч таких звеньев. Вольтамперометрическое определение гиалуроновой кислоты проводят в присутствии органического красителя фенософранина при использовании постоянно-токовой вольтамперометрии. В качестве индикаторного электрода используется ртутно-капающий электрод. В качестве фонового электролита буферный раствор Бриттона-Робинсона с рН 4.5. Содержание гиалуроновой кислоты в растворе оценивали по уменьшению высоты пика фенософранина в зависимости от концентрации гиалуроновой кислоты в ячейке [138].

При исследовании электрохимических свойств гиалуроновой кислоты в рабочих условиях определения коэнзима  $Q_{10}$  электрохимического сигнала получено не было. Однако, при введении раствора гиалуроновой кислоты в электрохимическую ячейку к коэнзиму  $Q_{10}$  происходило значительное увеличение аналитического сигнала коэнзима  $Q_{10}$  (рис. 5.7)

Подобно тиамину, гиалуроновая кислота имеет в своей структуре подвижные атомы водорода, которые она может отдавать, при этом восстанавливая окисленную форму коэнзима  $Q_{10}$  до убихинола, тем самым увеличивая его содержание в растворе (рис. 5.6) .



**Рисунок 5.6.** Предположительный механизм восстановления коэнзима Q<sub>10</sub> гиалуроновой кислотой.



**Рисунок 5.7.** Вольтамперограмма электроокисления коэнзима Q<sub>10</sub> ( $C_m = 0,0012 \text{ г/дм}^3$ ) -2; коэнзима Q<sub>10</sub> в присутствии витамина B<sub>1</sub> ( $C_m = 0,055 \text{ г/дм}^3$ ) – 3 в фосфатном буферном растворе на СУЭ.

И в этом случае, мы показываем также как аскорбиновая кислота и витамин B<sub>1</sub>, гиалуроновая кислота способна восстанавливать коэнзим Q<sub>10</sub>, увеличивая сигнал электроокисления коэнзима Q<sub>10</sub>.

В таблице 5.1 представлены обобщенные результаты по влиянию веществ различной природы на аналитический сигнал коэнзима Q<sub>10</sub>.

Влияние веществ различной природы на аналитический сигнал коэнзима  $Q_{10}$  ( $n=3$ ,  $P=0.95$ )

Исследуемое вещество	Соотношение концентрации коэнзима $Q_{10}$ к концентрации исследуемого вещества (г/дм <sup>3</sup> : г/дм <sup>3</sup> )	Ток электроокисления коэнзима $Q_{10}$ , I, мкА	
		До введения исследуемого вещества в раствор	После введения исследуемого вещества в раствор
Аскорбиновая кислота	1:10	33.7 ± 6.5	57.5 ± 13.1
Гиалуроновая кислота	1:40	31.1 ± 4.6	42.3 ± 6.3
Глутатион	1:25	30.3 ± 4.5	33.1 ± 5.0
Витамин В <sub>1</sub>	1:30	30.2 ± 4.0	40,7 ± 8,1
Витамин В <sub>6</sub>	1:40	30.9 ± 4.6	29.7 ± 4.5
Витамин В <sub>12</sub>	1:40	26.9 ± 4.0	27.1 ± 4.1
Бензоат натрия	1:2	28.1 ± 4.2	26.9 ± 4.0
Лимонная кислота	1:20	29.0 ± 4.4	28.6 ± 4.3
Стеариновая кислота	1:1	27.5 ± 4.1	28.0 ± 4.2

Являясь сильным антиоксидантом, коэнзим  $Q_{10}$  требует к себе очень бережного отношения. Механизм действия антиоксидантов одинаков. Окисляясь сами, они предохраняют от окисления другие вещества. Другими словами, они по определению должны легко окисляться. Как показали результаты наших экспериментов, такие вещества как: витамин С, витамин В<sub>1</sub> и гиалуроновая кислота препятствуют окислению коэнзима  $Q_{10}$  и увеличивают содержание его восстановленной формы в растворе. Влияние остальных веществ на аналитический сигнал коэнзима  $Q_{10}$  оказалось незначительным, находясь в пределах погрешности. При аналитическом определении содержания коэнзима  $Q_{10}$  влияние витамина С, витамина В<sub>1</sub>, гиалуроновой кислоты устраняется на стадии пробоподготовки при осаждении в осадок веществ, не растворимых в этаноле.

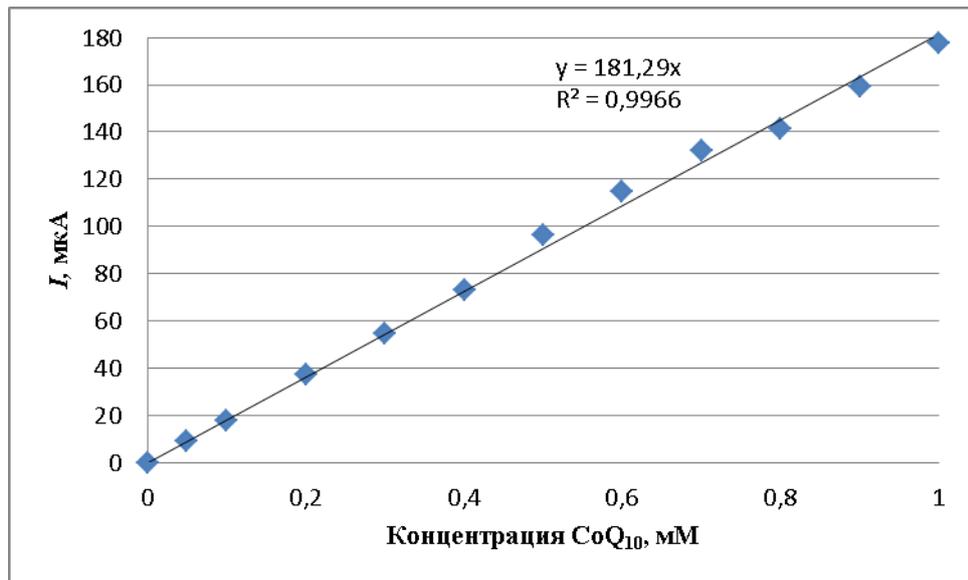
## **ГЛАВА 6. МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЭНЗИМА Q<sub>10</sub> В ПРОДУКЦИИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ И КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ**

### **Глава 6.1. Разработка вольтамперометрической методики определения содержания коэнзима Q<sub>10</sub> в фармацевтической и косметической промышленности**

В настоящее время широко развивается электроаналитический подход для разработки новых методов анализа веществ и соединений органической природы, которые имеют важное химическое и биологическое значение. Электрохимические методы анализа имеют ряд преимуществ: высокая чувствительность, экспрессность и простота аппаратного оформления. Они успешно применяются для количественного химического определения биологически активных веществ органической природы.

Полученные пики окисления-восстановления коэнзима Q<sub>10</sub> в модельных растворах на СУЭ могут быть использованы в качестве аналитических сигналов для разработки методики количественного определения коэнзима Q<sub>10</sub> в БАД и косметических препаратах методом вольтамперометрии.

Для разработки этой методики в качестве аналитического сигнала был использован сигнал электроокисления коэнзима Q<sub>10</sub> при  $E = 0.5$  В, где зависимость прироста предельного тока окисления от увеличения его концентрации в растворе линейна. Эта область находилась в диапазоне концентраций от  $0.05 \cdot 10^{-3}$  до  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup> (рис. 6.1). Данный диапазон концентраций достаточен для определения коэнзима Q<sub>10</sub> в фармацевтических и косметических объектах.



**Рисунок 6.1.** Градуировочный график зависимости аналитического сигнала коэнзима  $Q_{10}$  от его концентрации в фосфатном буферном растворе pH 6.86 на СУЭ

На основании полученных данных выведено уравнение регрессии зависимости изменения тока окисления коэнзима  $Q_{10}$  от его концентрации в растворе, в диапазоне концентраций от  $0.05 \cdot 10^{-3}$  до  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>:

$$I = 181,29 \cdot C \quad (6.1.)$$

Где,  $I$  – ток электроокисления коэнзима  $Q_{10}$ , мкА;

$C$  – концентрация коэнзима  $Q_{10}$ , М.

Предел обнаружения коэнзима  $Q_{10}$   $0.05 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup> достаточен для применения ее в оценке количественного содержания коэнзима  $Q_{10}$  в фармацевтических и косметических объектах.

Доказательство адекватности модели и гипотезы линейности графика проводили по методике, приведенной в работе [139].

Для проверки, правильно ли модель (в виде уравнения регрессии) описывает процесс, необходимо оценить адекватность этой модели. Для доказательства адекватности модели и гипотезы линейности графика построим таблицу зависимостей тока окисления коэнзима  $Q_{10}$  от его концентрации (табл. 6.1):

**Таблица 6.1.**

Экспериментальные значения высоты тока окисления коэнзима Q<sub>10</sub> (Y) от его концентрации в растворе (x).

№	x <sub>i</sub> , мМ	Y <sub>1i</sub> , мкА	Y <sub>2i</sub> , мкА	Y <sub>3i</sub> , мкА	$\bar{Y}_i$ , мкА
1	0.05	12,553	10,207	11,654	11,47133
2	0.1	20,278	21,215	19,411	20,30133
3	0.4	72,278	74,032	74,221	74,51033
4	0.6	109,9	112,654	114,369	112,3077
5	0.8	162,705	152,645	157,231	157,527
6	1.0	177,951	185,485	181,321	181,5857

Используя данные параллельных определений в каждом независимом опыте (табл. 6.1), определим дисперсию воспроизводимости измерений по формуле:

$$S_{\text{вос}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^6 \sum_{u=1}^3 (Y_{iu} - \bar{Y}_i)^2}{6(3-1)} = \frac{106}{12} = 9 \quad (6.2)$$

Далее оценим адекватность модели. Для удобства, расчеты произведем в таблице оценки адекватности модели (таблица 6.2), где Y<sub>i</sub><sup>\*</sup> - рассчитанные по уравнению (6.1) значения.

**Таблица 6.2.**

## Оценка адекватности модели

№	X	$\bar{Y}_i$	Y <sub>i</sub> <sup>*</sup>	( $\bar{Y}_i - Y_i^*$ )	( $\bar{Y}_i - Y_i^*$ ) <sup>2</sup>
1	0.05	11,47133	9,0645	-2,40683	5,792847
2	0.1	20,30133	18,129	-2,17233	4,719032
3	0.4	74,51033	72,516	-1,99433	3,977365
4	0.6	112,3077	108,774	-3,53367	12,4868
5	0.8	147,527	145,032	-2,495	6,225025
6	1.0	181,5857	181,29	-0,29567	0,087419
Σ					33,28849

Оценим дисперсию адекватности по формуле:

$$S_{ад}^2 = \frac{m \sum_{i=1}^n (\bar{Y}_i - Y_i^*)^2}{n - k} \quad (6.3)$$

$$S_{ад}^2 = \frac{3 \cdot 33,28849}{6 - 1} = 20 \quad (6.4)$$

Рассчитаем экспериментальное значение критерия Фишера:

$$F = \frac{S_{ад}^2}{S_{60c}^2} = \frac{20}{9} = 2.2 \quad (6.5)$$

Найдем табличное значение критерия Фишера для уровня значимости  $(1-P) = (1 - 0.95) = 0.05$  и числа степеней свобод:

$$f_1 = n - k = 6 - 1 = 5 \quad (6.6)$$

$$f_2 = n(m-1) = 6(3-1) = 12 \quad (6.7)$$

$$F_{0,05,f_1,f_2} = 3.9 \quad (6.8)$$

Расчетное значение критерия Фишера меньше табличного:

$$2.2 < 3.9 \quad (6.9)$$

Следовательно, данная модель адекватно описывает процесс.

Правильность методики количественного химического анализа определения коэнзима  $Q_{10}$  в модельных растворах проверялась методом «введено-найдено» (табл. 6.3).

**Таблица 6.3.**

Результаты количественного определения коэнзима  $Q_{10}$  в модельных средах ( $P = 0.95$ ,  $n = 3$ ).

Введено, $C \cdot 10^5$ моль/дм <sup>3</sup>	Найдено, $C \cdot 10^5$ моль/дм <sup>3</sup>	$\varepsilon$ , %
5	6,9	38
20	24,5	23
40	47,4	19
60	68,4	14
80	86,1	8
100	105,4	5

Из данных таблицы 6.3 следует, что данные, полученные по предлагаемому нами методу удовлетворительны.

Таким образом, оптимальные условия эксперимента, позволили нам использовать аналитический сигнал электроокисления коэнзима  $Q_{10}$  в модельных растворах для разработки методики суммарного количественного содержания коэнзима  $Q_{10}$  в косметических и фармацевтических препаратах.

### **6.1.1. Методика выполнения измерений количественного содержания коэнзима $Q_{10}$ в фармацевтических и косметических объектах**

При пробоподготовке очень важным этапом является изучение влияния мешающих факторов на аналитический сигнал исследуемого вещества. В данной работе изучено влияние на аналитический сигнал коэнзима  $Q_{10}$  различных соединений и ионов, которые являются электрохимически активными и содержатся в исследуемых объектах.

При изучении качественного состава анализируемых кремов и БАД (табл. 2.1., табл. 2.2) все компоненты по растворимости можно условно разделить на три группы: водорастворимые, жирорастворимые и спирторастворимые (табл. 6.4).

**Таблица 6.4.**

Таблица растворимости компонентов анализируемых кремов и БАД

Жирорастворимые	Водорастворимые	Спирторастворимые
<b>Биологически активные добавки</b>		
Токоферол ацетат	Бензоат натрия	Коэнзим $Q_{10}$
Аскорбил-пальмитат	Лимонная кислота	Кремофор
<b>Крема</b>		
Витамин А, Е, F	Гиалуроновая кислота	Коэнзим $Q_{10}$
Лецитин	Фруктовые кислоты	Масло соевое (ограниченно)
Карбопол	Аллантоин	Спирт цетиловый
Октокрилен	Эмульгатор Т-8	Стеариловый спирт
Трипептид меди	Креатин	
	Масло Арганы	
	Церамиды	

В дальнейшем исследовали влияние спирторастворимых компонентов на сигнал электроокисления коэнзима  $Q_{10}$ . Кремофор, масло соевое, спирт цетиловый, стеариловый спирт не вызывают изменения формы вольтамперограмм и не оказывают влияния на величину тока электроокисления окисления коэнзима  $Q_{10}$  в рабочих условиях проведения электрохимического процесса.

Подготовку проб биологически активных добавок и кремов, содержащих коэнзим  $Q_{10}$ , осуществляли следующим образом. На аналитических весах брали навеску крема массой 5 г с точностью до 0.0002 г (или с помощью дозатора отбирали 5 см<sup>3</sup> исследуемого БАД), вносили в колбу объемом 50 см<sup>3</sup>, растворяли навеску пробы в 50 см<sup>3</sup> 96-% этилового спирта. Полученный раствор нагревали в термостате до температуры 35<sup>0</sup>С, интенсивно перемешивали в течение 15 минут, после чего центрифугировали в течение 20 минут при скорости 4500 об/мин. Далее, для анализа дозатором отбирали аликвоту полученной надосадочной жидкости объемом 0.5 см<sup>3</sup>.

Методика определения коэнзима  $Q_{10}$  заключается в съемке вольтамперограмм окисления коэнзима  $Q_{10}$  на СУЭ при потенциале  $E = 0.5$  В. В электрохимическую ячейку помещали раствор фонового электролита (10 см<sup>3</sup>). В качестве фонового электролита использовали фосфатный буферный раствор рН = 6.86. Трехэлектродная ячейка состояла из индикаторного СУЭ, ХСЭ использовали в качестве электрода сравнения и вспомогательного электрода. Электроды опускали в раствор фонового электролита и подключали к анализатору ТА-2. Использовали постоянно-токовый режим анодной вольтамперометрии, скорость развертки потенциала  $W = 100$  мВ/с, рабочий диапазон потенциалов от (-)1.2 до 1.2 В, время электролиза вещества на электроде 60 с., потенциал электролиза (-)1.2 В, время успокоения 40 с. Далее, проводили съемку вольтамперограмм фонового электролита не менее трех раз. После получения доказательств

отсутствия загрязнений в фоновом растворе и воспроизводимой фоновой кривой переходили к работе с исследуемым веществом.

Количественно дозатором вносили определенный объем исследуемого раствора и проводили съемку вольтамперограмм в соответствии с последовательностью описанной выше. Расчет концентрации коэнзима  $Q_{10}$  в исследуемом растворе проводили двумя методами: методом добавок и методом градуировочного графика.

#### 1. Метод добавок.

Сначала регистрируется вольтамперограмма исследуемого раствора, затем к раствору добавляется известное количество стандартного раствора  $C_{ст}$  и снова регистрируется вольтамперограмма. Концентрация исследуемого раствора  $C_x$  находится по уравнению:

$$C_x = C_{ст} \cdot I_x / (I_{ст+x} - I_x) \quad (6.10)$$

где  $I_x$  – высота тока исследуемого раствора;  $I_{ст+x}$  – высота тока исследуемого раствора с добавкой стандартного вещества.

#### 2. Метод градуировочного графика.

Готовят серию стандартных растворов коэнзима  $Q_{10}$  различной концентрации и измеряют высоту тока окисления в одинаковых условиях. Строят графики зависимости высоты аналитического сигнала от концентрации коэнзима  $Q_{10}$ . Для повышения точности определения число точек на графике должно быть не меньше трех-четырех. Затем, определяют высоту тока окисления исследуемого раствора  $I_x$  и по графику находят соответствующее ей значение концентрации  $C_x$ .

Интервал концентраций стандартных растворов подбирают таким образом, чтобы концентрация исследуемого раствора соответствовала примерно середине этого интервала.

### 6.1.2. Подготовка вольтамперометрической методики определения коэнзима Q<sub>10</sub> к метрологической аттестации

Для подготовки методики к метрологической аттестации определили следующие метрологические характеристики методики:

1. Показатель повторяемости – рассчитывается в виде СКО результатов, полученных в условиях повторяемости;
2. Показатель внутрилабораторной прецизионности – рассчитывается в виде СКО результатов, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности (в разное время, разные операторы, мерная посуда);
3. Показатель точности методики – рассчитывается в виде аддитивной суммы характеристик случайной и систематической погрешности.

Алгоритм расчета приведен в приложении 1.

Обобщенные результаты показателей качества методики для диапазона исследуемых концентраций CoQ<sub>10</sub>, представлены в таблице 6.4.

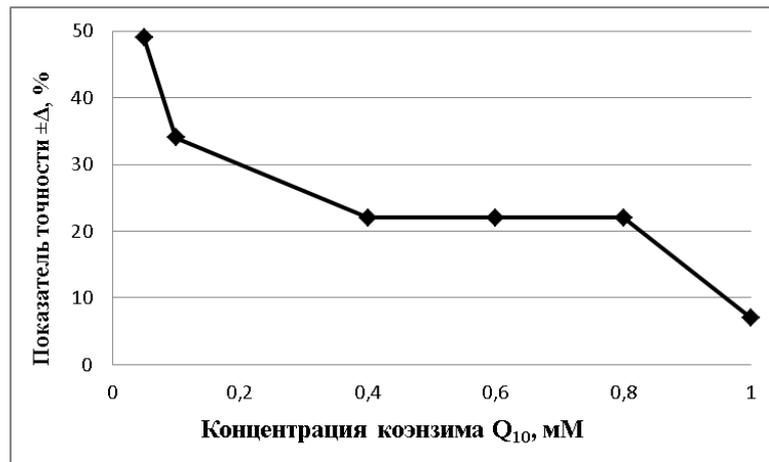
**Таблица 6.5.**

Значение показателей точности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности ( $p = 0.95$ ,  $n = 2$ ,  $l = 15$ )

Молярная концентрация коэнзима Q <sub>10</sub> , мМ	Показатели прецизионности (относительные значения)		Показатель точности (границы относительной погрешности при $P = 0.95$ ), $\pm\Delta$ , %
	Показатель повторяемости, $\sigma_r$ , %	Показатель воспроизводимости $\sigma_R$ , %	
0,05	8	11	49
0,1	5	11	34
0,4	4	7	22
0,6	4	7	22
0,8	3	7	22
1	3	3	7

Из данных таблицы 6.5 видно, что при определении коэнзима  $Q_{10}$  вольтамперометрическим методом показатель точности не превышает 49%, показатели повторяемости и воспроизводимости 8 и 11 %, соответственно.

При рассмотрении численных значений качественных показателей методики рис. 6.2 можно заметить, что идет возрастание значений показателя повторяемости ( $\sigma_r$ ), воспроизводимости ( $\sigma_R$ ), точности результатов измерения ( $\pm\Delta$ ) при возрастании концентрации коэнзима  $Q_{10}$  в ячейке.



**Рисунок 6.2.** Изменение показателя точности вольтамперометрической методики определения коэнзима  $Q_{10}$  в зависимости от его концентрации.

Изменение качественных характеристик МВИ не носит линейный характер, в таком случае интервал оценки, разбиваем на диапазоны и каждому диапазону приписываем количественные характеристики (табл. 6.6).

**Таблица 6.6.**

Диапазон измерений, значения показателей точности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности ( $p = 0.95$ ,  $n = 2$ ,  $l = 15$ )

Диапазон измерений, мМ	Показатели прецизионности (относительные значения)		Показатель точности (границы относительной погрешности при $P = 0.95$ ), $\pm\Delta$ , %
	Показатель повторяемости, $\sigma_r$ , %	Показатель воспроизводимости $\sigma_R$ , %	
От 0,05 до 0,1	8	11	50
От 0,1 до 0,4	5	11	35
От 0,4 до 1	4	7	22

Указанные выше показатели качества результатов анализа являются установленными характеристиками погрешности для совокупности результатов анализа, полученных при соблюдении требований методики при ее реализации в отдельной лаборатории. Таким образом, были установлены рабочие условия для количественного определения содержания коэнзима  $Q_{10}$  в продукции фармацевтической и косметической промышленности. Найден диапазон линейной зависимости аналитического сигнала коэнзима  $Q_{10}$  от его концентрации, проверена гипотеза линейности градуировочной зависимости, оценена адекватность модели по критерию Фишера. Проведена оценка правильности методики методом «введено-найденно». Установлены основные метрологические характеристики разрабатываемой методики количественного определения содержания коэнзима  $Q_{10}$  в продукции фармацевтической и косметической промышленности (показатель точности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности).

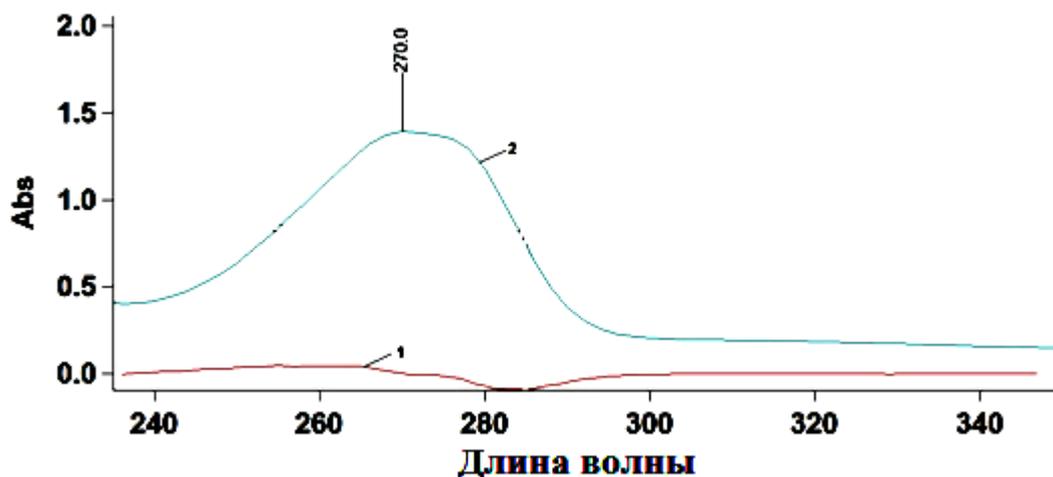
## **6.2. Определение содержания коэнзима $Q_{10}$ в БАД и косметических объектах методами вольтамперометрии и спектрофотометрии. Сравнительный анализ.**

Как уже было отмечено ранее, на сегодняшний день спектр методов количественного определения коэнзима  $Q_{10}$  в косметических и фармацевтических объектах очень разнообразен. Однако использование данных методов требует либо дорогих материалов и аппаратуры, либо применение данных методов осложнено громоздкими процедурами пробоподготовки. Кроме того, некоторые методики не обеспечивают необходимую чувствительность определения коэнзима  $Q_{10}$ .

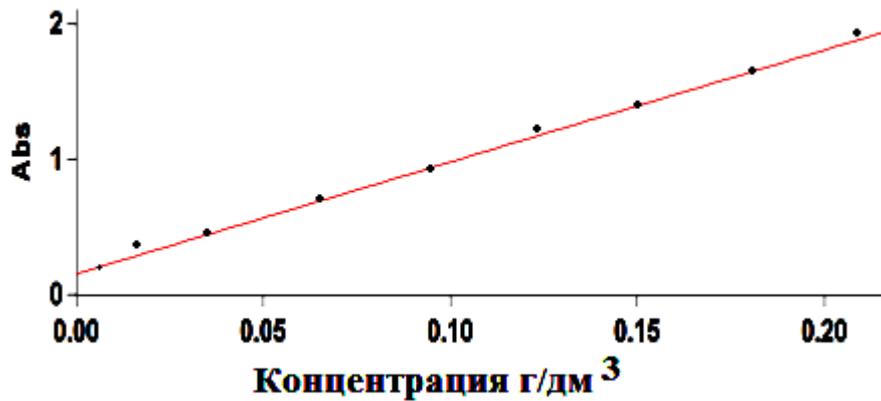
Целью данного раздела диссертации было определение количественного содержания коэнзима  $Q_{10}$  в фармацевтических и косметических препаратах методом добавок, используя разработанную вольтамперометрическую методику. Исследовали три коммерческих образца косметической продукции

и два образца фармацевтической продукции. В качестве метода сравнения был использован классический метод спектрофотометрии определения коэнзима  $Q_{10}$  в фармацевтических препаратах [61].

Спектрофотометрическая методика определения коэнзима  $Q_{10}$  основана на его способности генерировать спектр поглощения при длине волны  $\lambda = 275$  нм. Пробоподготовка стандартных образцов и анализируемых объектов производилась по методике, приведенной в п. 2.2, главы 2. Была построена калибровочная зависимость оптической плотности стандартного вещества коэнзима  $Q_{10}$  от его концентрации в кювете, которая была линейна в диапазоне концентраций от  $0.05$  г/дм<sup>3</sup> до  $0.2$  г/дм<sup>3</sup> (рис. 6.4) при следующих условиях: время интеграции 1 сек., спектральная пропускная способность канала 2 нм, шаг сканирования 0.1 сек. Все измерения оптической плотности осуществлялись на спектрофотометре Agilent Technology Cary 60 UV-Vis.



**Рисунок 6.3.** Спектр поглощения раствора коэнзима  $Q_{10}$  в гексане: 1- спектр растворителя; 2 – спектр раствора коэнзима  $Q_{10}$  ( $C = 0.15$  г/дм<sup>3</sup>)



**Рисунок 6.4.** Градуировочный график зависимости интенсивности сигнала поглощения коэнзима Q<sub>10</sub> от его концентрации в ячейке

Расчет концентрации коэнзима Q<sub>10</sub> проводили методом градуировочного графика.

### 6.2.1. Определение содержания коэнзима Q<sub>10</sub> в косметических препаратах

В косметологии активно используется положительное влияние коэнзима Q<sub>10</sub> на кожу. Рекомендуется сочетание наружное и внутреннее применение препаратов коэнзима Q<sub>10</sub>, поскольку при местном использовании коэнзима Q<sub>10</sub> затрагивает только самые поверхностные ороговевшие слои кожи, а глубже лежащие живые слои оказываются незатронутыми. Дополнительный прием коэнзима Q<sub>10</sub> особенно важен с учетом того фактора, что под действием ультрафиолета содержание его в клетках кожи падает.

В результате работы было определено содержание коэнзима Q<sub>10</sub> в кремах методами вольтамперометрии и спектрофотометрии. Результаты приведены в таблице 6.7.

Таблица 6.7.

Содержание коэнзима Q<sub>10</sub> в косметической продукции определенное спектрофотометрическим и вольтамперометрическим методами

Наименование крема	Вольтамперометрический метод $C_m$ (моль/дм <sup>3</sup> ) $\cdot 10^5$	Спектрофотометрический метод $C_m$ (моль/ дм <sup>3</sup> ) $\cdot 10^5$
Тайм Эксперт Коэнзим Q10 форте (крем для лица)	4,37 ± 2.185	4.33 ± 1.732
Nivea Q10 plus (крем для рук)	4,90 ± 2.45	4,86 ± 1.944
Дневной крем против морщин Eveline cosmetics	8.70 ± 4.35	8.05 ± 3.22
Declare age Control омолаживающий крем с CoQ <sub>10</sub>	9.20 ± 4.6	8.90 ± 3.56

По результатам исследований было найдено очень низкое содержание коэнзима Q<sub>10</sub> в таких кремах как Тайм Эксперт Коэнзим Q<sub>10</sub> форте и Nivea Q<sub>10</sub> plus. Низкое содержание коэнзима Q<sub>10</sub> в данных кремах может быть связано с нарушением технологии производства данных кремов, с неправильным хранением или с тем, что производители изначально добавили такое количество коэнзима в крема.

### 6.2.2. Определение содержания коэнзима Q<sub>10</sub> в БАД

Согласно существующим международным требованиям, сформулированным в документах Международной федерации фармпроизводителей, любое оригинальное и воспроизведенное лекарственное средство должно соответствовать следующим критериям: эффективность, безопасность, качество. Это в равной степени следует отнести и к БАД, требования к которым в современных условиях постоянно возрастают. Поэтому, контроль за качеством производимых БАД является сейчас актуальной задачей.

Таблица 6.8.

Результаты определения содержания коэнзима Q<sub>10</sub> в БАД «Кудесан Форте» раствор и БАД «Кудесан» раствор спектрофотометрическим и вольтамперометрическим методами.

Исследуемый БАД	Содержание по сертификату, C <sub>m</sub> ·10 <sup>4</sup> , М	Допускаемые отклонения по ТУ, C <sub>m</sub> ·10 <sup>4</sup> , М	Вольтамперометрический метод, C <sub>m</sub> ·10 <sup>4</sup> , М	Спектрофотометрический метод, C <sub>m</sub> ·10 <sup>4</sup> , М
«Кудесан Форте» раствор	2,5	2,3-2,8	2,6 ± 0,91	2,4 ± 0,96
«Кудесан» раствор	5	4,8-5,5	5,0 ± 1,1	4,9 ± 1,96

Как следует из данных таблицы 6.8, содержание коэнзима Q<sub>10</sub> во всех двух формах БАД соответствовало заявленной дозировке, находясь в пределах допустимых в ТУ пограничных значений.

Обобщая данные по определению содержания коэнзима Q<sub>10</sub> в косметических и фармацевтических препаратах спектрофотометрическим и вольтамперометрическим методами можно заметить, что результаты хорошо согласуются между собой.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ

В настоящее время для определения коэнзима  $Q_{10}$  в биологически активных добавках Европейская фармакопейная организация рекомендует использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию со спектрофотометрическим детектированием при 275 нм или спектрофотометрию. Однако, электрохимические методы анализа в последнее время активно используются для определения разнообразных органических соединений в широком диапазоне концентраций. Благодаря простоте аппаратного оформления, возможности автоматизации и экспрессности, метод вольтамперометрии занял достойное место среди методов анализа, используемых в современных лабораториях, занимающихся контролем качества продукции.

При создании любой методики очень важным шагом является определение влияния различных факторов на аналитический сигнал исследуемого вещества. В вольтамперометрии такими факторами являются материал индикаторного электрода, природа фонового электролита и рН раствора.

В практике электрохимических исследований и анализа получили распространение самые разнообразные индикаторные электроды. Выбор электрода зависит от поставленной задачи, определяемого вещества, его концентрации, электролита. Основным требованием к рабочему электроду является получение с его помощью воспроизводимого аналитического сигнала. При исследовании электрохимического поведения коэнзима  $Q_{10}$  в качестве индикаторных электродов были выбраны стеклоуглеродный и ртутно-пленочный электрод. При проведении исследований был найден четкий и воспроизводимый аналитический сигнал коэнзима  $Q_{10}$  на стеклоуглеродном электроде, на ртутно-пленочном сигнал получен не был. Поэтому, в дальнейшем, для создания методики использовали более

чувствительный и нетоксичный по сравнению с РПЭ стеклоуглеродный электрод.

Следующим этапом работы стало изучение влияния природы фонового электролита на аналитический сигнал коэнзима  $Q_{10}$ . Для исследования электрохимических свойств коэнзима  $Q_{10}$  в водных средах выбрали фосфатный буферный раствор с рН 6.86. В данных условиях, как уже говорилось ранее, получили устойчивый и воспроизводимый аналитический сигнал коэнзима  $Q_{10}$ . Хиноны, в частности коэнзим  $Q_{10}$ , в водных растворах, акцептируя электрон, восстанавливаются в анион-радикал, который затем принимает еще один электрон, образуя дианион-радикал, при последующем протонировании переходит в соответствующий гидрохинон или, присоединяя протон, диспропорционирует в хинон и гидрохинон. Благодаря этим свойствам природные хиноны – убихинон, пластохинон, филлохинон – и их радикальные формы участвуют в переносе электронов и в сопряжении одно- и двухэлектронных реакций в биологических мембранах [140].

Для изучения электрохимического поведения убихинона в апротонных средах выбрали безводный ацетонитрил. В качестве фонового электролита использовали перхлорат натрия. В результате чего получили циклическую вольтамперограмму окисления-восстановления коэнзима  $Q_{10}$ . Пики окисления и восстановления находились в области потенциалов  $E_a = 1\text{В}$ ,  $E_k = -0.1\text{В}$ , соответственно. В отсутствие протонов на электроде протекает двухэлектронная необратимая реакция восстановления коэнзима  $Q_{10}$  с образованием дианионного радикала как конечного продукта. Однако, данный сигнал оказался нестабильным и плоховоспроизводимым. Предположительно, это связано с тем, что перхлорат-ионы обладают большой окислительной способностью, тем самым разрушая компоненты системы, поэтому, в дальнейшем, для создания вольтамперометрической методики определения коэнзима  $Q_{10}$  в косметических и фармацевтических препаратах, приняли решение использовать водные буферные растворы для

стабилизации аналитического сигнала, улучшения его воспроизводимости, а также для увеличения чувствительности разрабатываемой методики.

В связи с участием протонов в электрохимической реакции, следующим этапом стало изучение влияния рН фонового электролита на процесс окисления и восстановления коэнзима  $Q_{10}$ .

По результатам исследований стало ясно, что при увеличении кислотности среды анодный ток окисления увеличивается, а катодный ток восстановления уменьшается. Предполагается, что в кислой среде происходит протонизация молекулы коэнзима  $Q_{10}$ , что облегчает его окисление. В щелочной среде наблюдается увеличение тока восстановления коэнзима  $Q_{10}$  вследствие полной диссоциации гидроксильной группы (-ОН) гидрохинонной части молекулы коэнзима  $Q_{10}$  и как следствие, облегчение процесса восстановления.

Из литературных источников известно, что молекула коэнзима чувствительна к физико-химическим воздействиям, например, в щелочной, кислой среде и под действием света она становится нестабильна и начинает самопроизвольно трансформироваться. Поэтому, в дальнейшем для создания вольтамперометрической методики определения коэнзима  $Q_{10}$  в качестве фонового электролита был выбран фосфатный буфер с рН 6.86. Это обусловлено стабильностью молекулы коэнзима  $Q_{10}$  в водных нейтральных средах. В качестве индикаторного электрода использовать СУЭ.

В дальнейшем изучили влияние параметров электролиза (время и потенциал электролиза), а так же скорости развертки потенциала на аналитический сигнал электроокисления коэнзима  $Q_{10}$ . Наиболее выраженный аналитический сигнал был получен при установлении следующих параметров: потенциал электролиза -1.2 В, время электролиза 60 секунд, скорость развертки потенциала 100 мВ/с, время успокоения 40 секунд.

Следующим этапом работы стало исследование предположительного механизма электровосстановления коэнзима  $Q_{10}$  на поверхности СУЭ. Для описания механизма электровосстановления убихинона на СУЭ в водных нейтральных средах была исследована обратимость этого процесса. В вольтамперометрии одним из критериев обратимости процессов является линейная зависимость тока от  $W^{1/2}$  для обратимых и необратимых процессов, кроме квазиобратимого процесса. Данная зависимость, построенная для процесса электровосстановления коэнзима  $Q_{10}$  на СУЭ в водных нейтральных средах носит нелинейный характер, что говорит о квазиобратимости процесса. Так же были доказаны критерии наличия последующей химической реакции при протекании процесса электровосстановления коэнзима  $Q_{10}$  на СУЭ.

Коэнзим  $Q_{10}$  и его аналоги эффективно взаимодействуют с кислородными радикалами. Антиоксидантное действие коэнзима  $Q_{10}$  обусловлено главным образом его восстановленной формой ( $CoQH_2$ ). Активность восстановленной формы коэнзима  $Q_{10}$  на три порядка выше невосстановленной [1]. При исследовании антиоксидантной активности коэнзима  $Q_{10}$  методом катодной вольтамперометрии была выявлена закономерность изменения критерия антиоксидантной активности от концентрации коэнзима  $Q_{10}$  в растворе. В области концентраций от  $0.5 \cdot 10^{-3}$  до  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup> коэнзим  $Q_{10}$  проявил свою наибольшую антиоксидантную активность.

Далее в работе было изучено влияние на аналитический сигнал коэнзима  $Q_{10}$  различных соединений и ионов, которые могут являться электрохимически активными и содержаться в исследуемых объектах. Наши исследования показали, что наибольшее влияние на аналитический сигнал коэнзима  $Q_{10}$  оказывают витамин С, гиалуроновая кислота и витамин В<sub>1</sub>. Все эти вещества в рабочих условиях определения коэнзима  $Q_{10}$  оказались неэлектроактивными, однако, при совместном определении коэнзима  $Q_{10}$  с этими веществами происходило значительное увеличение сигнала

электроокисления коэнзима  $Q_{10}$ , предполагается, что это обстоятельство связано с тем, что данные вещества способны восстанавливать коэнзим  $Q_{10}$  из раствора тем самым увеличивая его содержание в электрохимической ячейке. В дальнейшем было найдено минимально соотношение концентрации коэнзима  $Q_{10}$  к концентрации исследуемых веществ, при котором происходит увеличение сигнала электроокисления.

Учитывая все вышеперечисленные результаты, разработали вольтамперометрическую методику определения содержания коэнзима  $Q_{10}$  в фармацевтических и косметических препаратах. В качестве индикаторного электрода рекомендуется использовать СУЭ, фоновый электролит – фосфатный буферный раствор с рН 6.86. Режим постоянно-токовой анодной вольтамперометрии. При данных условиях найдена линейная зависимость высоты аналитического сигнала коэнзима  $Q_{10}$  от его концентрации в электрохимической ячейке, она находилась в диапазоне концентраций от  $0.05 \cdot 10^{-3}$  до  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>. Предел обнаружения коэнзима  $Q_{10}$   $0.5 \cdot 10^{-5}$  моль/ дм<sup>3</sup> достаточен для применения его в оценке количественного содержания коэнзима  $Q_{10}$  в фармацевтических и косметических объектах. Так же были установлены метрологические показатели качества методики.

Заключительным этапом работы стало сравнительное определение содержания коэнзима  $Q_{10}$  в фармацевтических и косметических препаратах спектрофотометрическим и вольтамперометрическим методами. Результаты, полученные двумя методами, хорошо согласуются между собой.

## ВЫВОДЫ

1. Изучены физико-химические закономерности протекания реакции окисления - восстановления коэнзима  $Q_{10}$  на поверхности СУЭ. Предположено, что на поверхности электрода в водных нейтральных средах идет квазиобратимый процесс, осложненный наличием последующей химической реакцией при участии двух протонов и двух электронов (механизм ЕС – electrochemical-chemical).

2. Исследованы антиоксидантные свойства коэнзима  $Q_{10}$  вольтамперометрическим методом в зависимости от его концентрации в ячейке. Предложен механизм взаимодействия коэнзима  $Q_{10}$  с кислородом и его активными радикалами.

3. Оценено влияние веществ различной природы, содержащихся в косметических и фармацевтических продуктах, на аналитический сигнал коэнзима  $Q_{10}$ . Выявлено, что наибольшее влияние на сигнал электроокисления коэнзима  $Q_{10}$  оказывают витамин С, гиалуроновая кислота и витамин В<sub>1</sub>.

4. Подобраны оптимальные условия вольтамперометрического определения коэнзима  $Q_{10}$  в косметических и фармацевтических препаратах: индикаторный электрод – СУЭ, анодная постоянно-токовая вольтамперометрия с областью потенциалов от - 1.2 В до 1.2 В, скорость развертки потенциала 100 мВ/с, использование калий дигидрофосфата с рН 6.86 в качестве фонового электролита. Определена область прямолинейной зависимости интенсивности аналитического сигнала от концентрации коэнзима  $Q_{10}$  в диапазоне от  $0.05 \cdot 10^{-3}$  до  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>.

5. Проведены сравнительные определения содержания коэнзима  $Q_{10}$  в фармацевтических и косметических препаратах вольтамперометрическим и спектрофотометрическими методами.

## Список литературы

1. Borekova M. Nourishing and health benefits of coenzyme Q10 – a review/ Hojerova J., Koprda V., Bauerova K.// Czech J. Food Sci. – 2008. - Vol. 26(4). – pp. 229-241.
2. Michalkiewicz S. Voltammetric determination of coenzyme Q10 in farmaceutical dosage forms// Bioelectrochemistry. – 2008. – Vol. 73. – pp. 30-36.
3. Olson R. E. Karl August Folkers// Journal of Nutrition. – 2001. – Vol. 131(9). – pp. 2227-2230.
4. Littaru G. P. Deficiency of coenzyme Q10 in human heart disease. Part I and II/ Ho L., Folkers K.// International Journal for Vitamin and Nutrition Research. – 1972. – Vol. 42(2,3). – p. 291, 413.
5. Ланкин В.З. Свободнорадикальные процессы при заболевании сердечнососудистой системы / Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. // Кардиология. - 2000.-Т.40,№7.-С.48-61.
6. Crane, F.L., Morre, D.J. Evidence for coenzyme Q function in Golgi membranes / Folkers, K., Yamamura, Y. // Biomedical and clinical Aspects of Coenzyme Q. 1977. - pp. 3–14.
7. Crane F.L. Biochemical functions of coenzyme Q10 // Journal of the American College of Nutrition. – 2001. – Vol. 20. – pp. 591–598.
8. Quinzii C.M. Human coenzyme Q10 deficiency / Dimauro S., Hirano M. // Neurochemical Research. – 2007. – Vol. 32. – pp. 723–727.
9. James A.M. Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial coenzyme CoQ10 / Smith R.A.J., Murphy M.P. // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2004. – Vol. 423. - pp. 47–56.
10. Littarru G.P. Energy and defense. Facts and perspectives on coenzyme Q10 in biology and medicine. // Casa Editrice Scientifica Internazionale. – 1994. – pp. 1–91.

11. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита // Соросовский Образовательный Журнал. – 1999. – № 1. – С. 7-10.
12. Чапидзе Г.Э. Комбинированная терапия антиоксидантным коэнзимом Q10 и симвастатином больных коронарным атеросклерозом / Капанадзе С.А., Долидзе Н.К., Лацабидзе Н.Э., Бахуташвили З.В. // Кардиология. – 2006 г. – № 8. – С.11-13.
13. Turkowicz M., J., Karpinska J. Analytical Problems with determination of Coenzyme Q10 in Biological Samples // Biofactors. – 2013. – Vol. 39(2). – pp. 176-185.
14. Kubo H. Food content of ubiquinol-10 and ubiquinon-10 in the Japanese diet / Fujii K., Kawabe T., Matsumoto S. // Food Comp. Anal. – 2008. – Vol. 21. – pp. 199 – 210.
15. Wakabayashi, H. Simultaneous determination of oxidized and reduced coenzyme Q and a-tocopherol in biological samples by high performance liquid chromatography with platinum catalyst reduction and electrochemical detection / Yamato, S., Nakajima, M., and Shimada, K. // Biol. Pharm. Bull. – 1994. – Vol. 17. – pp. 997–1002.
16. Ikenoya S. Studies on reduced and oxidized ubiquinones.I. Simultaneous determination of reduced and oxidized ubiquinones in tissues and mitochondria by high performance liquid chromatography / Takada, M., Yuzuriha, T., Abe, K., Katayama, K. // Chem. Pharm. Bull. – 1981. – Vol. 29. – pp. 158–164.
17. Pastore, A. Simultaneous determination of ubiquinol and ubiquinone in skeletal muscle of pediatric patients / Di Giovamberardino, G., Bertini, E., Tozzi, G., Gaeta, L. M. // Anal. Biochem. – 2005. – Vol. 342. – pp. 352–355.
18. Rodrigues-Estrada M. T. Determination of coenzyme Q10 in functional and neoplastic human renal tissues / Poerio, A., Mandrioli, M., Lercker, G., Trincherо, A. // Anal. Biochem. – 2006. – Vol. 357. – pp. 150–152.

19. Wang, Q. Automated High-performance liquid chromatographic method with precolumn reduction for the determination of ubiquinol and ubiquinone in human plasma / Lee, B. L., and Ong, C. N. J. // *Chromatogr.* - 1999 - Vol. 726. - pp. 297–302.
20. Laguna, T. A. Decreased serum coenzyme Q10 concentrations: a longitudinal study in children with cystic fibrosis / ., Sontag, M. K., Osberg, I., Wagener, J. S., Accurso, F. J. // *J. Pediatr.* - 2008. - Vol. 153. - pp. 402–407.
21. Teshima, K. and Kondo, T. Analytical method for ubiquinone-9 and ubiquinone-10 in rat tissues by liquid chromatography/turbo ion spray tandem mass spectrometry with 1-alkylamine as an additive to mobile phase. *Anal. Biochem.* - 2005. - Vol. 338. - pp. 12–19.
22. Leray, C. Simultaneous determination of homologues of vitamin E and coenzyme Q and products of  $\alpha$ -tocopherol oxidation / Andriamampandry, M. D., Freund, M., Gachet, C., and Cazenave, J.-P. // *J. Lipid Res.* - 1998. - Vol. 39. - pp. 2009–2104.
23. Yoshida, Y. Evaluation of the dietary effects of coenzyme Q in vivo by the oxidative stress marker, hydroxyoctadecadienoic acid and its stereoisomer ratio / Hayakawa, M., Habuchi, Y., and Niki, E. // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2006. - Vol. 1760. - pp. 1558–1568.
24. Souchet, N. and Laplante, S. Seasonal variation of Co-enzyme Q10 content in pelagic fish tissues from Eastern Quebec.// *J. Food Comp. Anal.* -2007. - Vol. 20. - pp. 403–410.
25. Finckh, B. Monitoring of Ubiquinol-10, ubiquinon-10, carotenoids, and tocopherols in neonatal plasma microsamples using High-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection / Kontush A., Hubner, J. C., Burdelski, M., and Kohlschutter, A. // *Anal. Biochem.* - 1995. - Vol. 232 . - pp. 210–216.
26. Li, L. Analysis of CoQ10 in rat serum by ultra-performance liquid chromatography mass spectrometry after oral administration / Pabbisetty, D.,

- Carvalho, P., Avery, M. A., and Avery, B. A. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2008. – Vol. 46. – pp. 137–142.
27. Ruiz-Jimenez J. Determination of the ubiquinol-10 and ubiquinone-10 in human serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry to evaluate the oxidative stress. / Priego-Capote F., Mata-Granados J. M., Quesada J. M., Luque de Castro M. D. // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – Vol. 1175. – pp. 242-248.
28. Mosca F. Assay of coenzyme Q10 in plasma by a single dilution step. / Fattorini D., Bomparde S., Littarru G. P. // *Anal. Biochem.* – 2002. – Vol. 305. – pp. 49-54.
29. Tang P. H. HPLC analysis of reduced and oxidized coenzyme Q10 in human plasma. / Miles M. V., DeGrauw A., Hertshey A., Pesce A. // *Clin. Chem.* – 2001. – Vol. 47. – pp. 256-265.
30. Redalieu E. Determination and levels of coenzyme Q10 in human blood. / Nilsson I. M., Harley T. M., Folkers K., Koniuszy F. R. // *Anal. Biochem.* – 1968. – Vol. 23. – pp. 132-140.
31. Morita M. A new method to determine the level of coenzyme Q10 in one drop of human blood for biomedical research. / Folkers K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – Vol. 191. – pp. 950-954.
32. Karpinska J. HPLC method for simultaneous determination of retinol,  $\alpha$ -tocopherol and coenzyme Q10 in human plasma. / Mikoluc B., Motkowski R., Piotrowska-Jastrebska J. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2006. – Vol. 42. – pp. 232-236.
33. Yamashida S. Simultaneous detection of ubiquinol and ubiquinone in human plasma as marker of oxidative stress. / Yamamoto Y. // *Anal. Biochem.* 1997. – Vol. 250. – pp. 66-73.
34. Katayama K. Simultaneous determination of ubiquinone-10 and ubiquinol-10 in tissue and mitochondria by HPLC / Takada M., Yuzurihira T., Abe K.,

- Ikenoya S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1980.- Vol. – 95. – pp. 971-977.
35. Hang Y. Analysis of ubiquinone and tocopherol levels in normal and hyperlipidemic plasma. / Ericsson M., Dallner G., Appelkvist E. L. // *Lipids.* – 1998. – Vol. 33. – pp. 811-815.
36. Niklowitz P. Coenzyme Q10 in plasma and erythrocytes: comparison of antioxidant levels in healthy probands after supplementation and in patients suffering from sickle cell anemia. / Menke T., Wiesel T., Mayatepek E., Zschocke J. // *Clin. Chim. Acta.* – 2002. – Vol. 326. – pp. 155-161.
37. Greenspan M. D. Separation and identification of triglycerides, cholesteryl esters, cholesterol, 7-dehydrocholesterol, dolichol, ubiquinone,  $\alpha$ -tocopherol, and retinol by high performance liquid chromatography with a diode array detector. / Lo C.-Y., Hanf D. P., Yudkovitz J. B. // *J. Lipid Res.* – 1988. – Vol. 29. – pp. 971-977.
38. Belanger M. Environmental contaminants and redox status of coenzyme Q10 and vitamin E in Inuit from Nunavik. / Mirault M., Dewailly E., Berthiaume L., Julien P. // *Met. Clin. Exp.* – 2008. – Vol. 57. – pp. 927-933.
39. Kommuru T. R. A simplified chromatographic method for quantitative determination of coenzyme Q10 in dog plasma. / Khan M. A., Ashrafi M., Kattenacker R., Reddy I. K. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1998. – Vol. 16. – pp. 1037-1040.
40. Paliakov E. M. Rapid quantitative determination of fat-soluble vitamins and coenzyme Q10 of fat-soluble vitamins and coenzyme Q10 in human serum by reversed ultra-high pressure liquid chromatography with UV detection. / Crow B. S., Bishop M. J., Norton D. // *J. Chromatogr.* – 2009. – Vol. 877. – pp. 89-94.
41. Redalieu E. New procedures for assay and stability of coenzyme Q10 in human blood. / Nilsson I. M., Nilsson J. L. G., Kjaer-Pedersen D. L., Folkers K. // *Int. Z. Vitaminforsch.* – 1968. – Vol. 38. – pp. 345-354.

42. Mattila P. Coenzyme Q9 and coenzyme Q10: contents in foods and dietary intake. / Kumpullainen J. // *J. Food Comp. Anal.* – 2001. – Vol. 14. – pp. 409-417.
43. Dhandayuthapani S. Quinones in *Penetrocephalus ganapatii* (Cestoda: Pseudophyllidea) / Nellaiappan K., Ramalingam K. // *J. Parasitol.* – 1983. – Vol. 68. – pp. 996-998.
44. Abe K. Determination of ubiquinone in serum and liver by high-speed liquid chromatography. / Ishibashi K., Ohmae M., Kawabe K., Katsu G. // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* – 1978. – Vol. 24. – pp. 555-567.
45. Linn B. O. Coenzyme Q. XII. Ethoxy homologs of coenzyme Q10. Artifact of isolation. / Trenner N. R., Arison B. H., Wetson R. G. Shunk C. H. // *J. Am. Chem. Soc.* – 1960. – Vol. 82. – pp. 1647-1651.
46. Weber C. Coenzyme Q10 in diet daily intake and relative bioavailability. / Bysted A., Holmer G. // *Mol. Aspects Med.* – 1997. – Vol. 18. – pp. 251-254.
47. Bhagavan H. N. Assessment of coenzyme Q10 absorption using an in vitro digestion-Caco-2 cell model. / Chopra R. K. Craft N. E. Chitchumroonchokchai C. Failla M. L. // *Int. J. Pharm.* – 2007. – Vol. 333. – pp. 112-117.
48. Purchas R. W., Busboom J. R. The effect of production system and age on levels of iron, taurine, carnosine, coenzyme Q10 and creatine in beef muscles and liver // *Meat Sci.* – 2005. – Vol. 70. – pp. 589-596.
49. Purchas R. W. Concentration in beef and lamb of taurine, carnosine, Q10 and creatine. / Rutherford S. M., Pearce P. D., Vather R., Wilkinson B. H. P. – 2004. – Vol. 66. – pp. 629-637.
50. Weber C. Intestinal absorption of coenzyme Q10 administered in a meal or as capsules to healthy subjects. / Bysted A., Holmer G. // *Nurt. Res.* – 1997. – Vol. 17. – pp. 941-945.
51. Breithaupt D. E., Kraute S. Simultaneous determination of the vitamins A, E, their esters and coenzyme Q10 administered in a multivitamin dietary

- supplements using an RP-C30 phase. // *Eur. Food Res. Technol.* – 2006. – Vol. 222. – pp. 643-649/
52. Grossi G. Improved high-performance liquid chromatography method for determination of coenzyme Q10 in plasma. / Bargossi A. M., Fiorella P. L., Piazzzi S., Battino N. // *J. Chromatogr.* – 1992. – Vol 593. – pp. 217-226.
53. Kaplan P. Determination of Coenzyme Q10 in human plasma. / Sebastianowa N., Turiakowa J., Kucers I. // *Physiol. Res.* - 1996. – Vol. 45. – pp. 39-45.
54. Rodriguez-Acuna R. Determination of coenzyme Q9 and Q10 in vegetable oils. / Brenne E., Lakoste F. // *J. Agr. Food Chem.* – 2008. Vol. – 56. – pp. 6241-6245.
55. Bule M. Singhal R. S. Development of a protocol for supercritical carbon dioxide extraction of ubiquinone-10 from dried biomass of *Pseudomonas diminuta*. // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* – 2012. – Vol. 35. – pp. 809-816.
56. Irvan, Atsuta Y. Supercritical carbon dioxide extraction of ubiquinones and menaquinones from activated sludge. / Saeki T., Daimon H., Fujie K. // *J. Chromatogr. A.* – 2006. – Vol. 113. – pp. 14-19.
57. Matsubara A. High-accuracy system for the redox status of coenzyme Q10 by online supercritical fluid chromatography/mass spectrometry. / Harada K., Hirata K., Fukusaki E., Bamba T. // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – Vol. 1250. – pp. 76-79.
58. Lonrot K. Coenzyme Q10 supplementation and recovery from ischemia in senescent rat myocardium. / Tolvanen J. P. Porsti I., Ahola T., Hervonen A. // *Life Sci.* – 1999. – Vol. 64. – pp. 315-323.
59. European pharmacopeia 5.0, Vol. 2, Council of Europe, Strasbourg, 2004.
60. Koniuszy F. R. Coenzyme Q XII. Isolation, assay and human urinary levels of coenzyme Q10. / Gale P. H., Page A. C., Folkers K. // *Archiv. Biochem. Biophys.* – 1960. – Vol. 87. – pp. 298-305.
61. Karpinska J. The analysis of the zero-order and the second derivative spectra of retinol acetate, tocopherol acetate and coenzyme Q10 and estimation of their

- analytical usefulness for their simultaneous determination in synthetic mixtures and pharmaceuticals. / Karpmska J., Mularczyk B. // *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* – 2004. – Vol. 60(10). – pp. 2189-2194.
62. Karpinska J., Frankowska R. Application of tocopherol acetate as internal standart in UV-derivative spectrophotometric analysis of coenzyme Q10. – 2004. – Vol. 32(3). – pp. 281-290.
63. Pauls R. Mobile-phase effects in the reversed phase liquid chromatographic separation of coenzyme Q (ubiquinone) homologues. / Pauls R. // *J. Chromatogr. Sci.* – 1985. – Vol. 23(4). – pp. 181-184.
64. Andersson S. Determination of coenzyme Q by non-aqueous reversed-phase liquid chromatography / Andersson S. // *J. Chromatogr.* – 1992. – Vol. 606(2). – pp. 272-276.
65. Duncan A. Determination of coenzyme q10 status in blood mononuclear cells, skeletal muscle, and plasma by HPLC with di-propoxy-coenzyme q10 as an internal standard / Duncan A. Heales S., Mills K. // *Clin Chem.* – 2005. – Vol. 51(12). – pp. 2380-2382.
66. Okamoto T. High-performance liquid chromatography of coenzyme Q-related compounds and its application to biological materials. / Okamoto T., Fukui K. // *J chromatogr.* – 1985. – Vol. 342(1). – pp. 35-46.
67. Kaprinska J. HPLC method for simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and coenzyme Q10 in human plasma / Kaprinsca J., Micoluc B., Motkowski R. // *J Pharm Biomed Anal.* – 1998. – Vol. 17(8). – pp. 232-236.
68. Tang P. H. Measurement of reduced and oxidized coenzyme Q9 and coenzyme Q10 levels in mouse tissue by HPLC with coulometric detection / Tang P., Miles M. // *Clin Chim Acta.* – 2004. – Vol. 341(1-2). – pp. 173-184.
69. Aberg F. Distribution and redox state of ubiquinones in rat and humah plasma. / Appelkvist E., Dallner G., Ernster L. // *Archiv. Biochem. Biophys.* – 1992. – Vol. 259. – pp. 230-234.

70. Galinier A. Biological validation of coenzyme Q redox state by HPLC-EC measurement: relationship between coenzyme Q redox state and coenzyme Q contents in rat tissue. / Carriere A., Fernandez Y., Bessac A. M., Caspar-Bauguil S. // FEBS Lett. – 2004. – Vol. 578. – pp. 53-57.
71. Zu Y. A rapid and sensitive LC-MS/MS method for determination of coenzyme Q10 in tobacco (*Nicotinia tabacum* L.) leaves / Zu Y., Zhao C. // Clin. Chim. Acta. – 2004. – V. 341. – P. 173-184.
72. Hansen G. Sensitive and selective analysis of coenzyme Q10 in human serum by negative APCI LC-MS / Hansen G., Christensen E., Tuchsén E. // Analyst. – 2004. – V. 129, N1. – P. 45-50.
73. Jiang P. Analysis of coenzyme Q10 in human plasma by column-switching liquid chromatography / Jiang P., Wu M. // J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. – 2004. – V. 805, N2. – P. 297-301.
74. Yang H. Song J. High-sensitive determination of coenzyme Q10 in iodinate- $\beta$ -cyclodextrine medium by inclusion reaction and catalytic polarography. // Anal. Biochem. – 2006. – Vol. 348. – pp. 69-74.75.
75. Haitham A. AL-Wahab, Sadallah T. Sulaiman, I'timad I. Taha. Square Wave Voltammetry determination of coenzyme Q10. // Raf. Jour. Sci. – 2006. – Vol. 17(4). – pp. 86-91.
76. Litescu S-C. Voltammetric determination of coenzyme Q10 at a solid glassy carbon electrode. // Instrumentation Science & Technology. – 2001. – Vol. 29(2). – pp. 109-116.
77. Биохемилюминесценция / Под ред. А.И. Журавлева. М.: Наука, 1983. – 345 с.
78. Исследование синтетических и природных антиоксидантов *in vitro* и *in vivo* / Сборник науч. статей – М.: Наука, 1992. – 110 с.
79. Беляков В.А., Васильев Р.Ф., Федорова Г.Ф. Кинетика жидкофазного окисления дифенилметана при умеренных температурах // Кинетика и катализ. – 1996. Т.37, №4. С. 542-552.

80. Васильев Р.Ф., Вичутинский А.А., Черкасов А.С. Хемиллюминесценция, активированная производными антрацена // Доклады АН СССР. – 1963. – Т.149, №1. – С. 124-127.
81. Беляков В.А., Васильев Р.Ф., Федорова Г.Ф. О переносе энергии с химически возбуждаемых карбонильных соединений на производные антрацена и кислород // Известия АН СССР. Сер. физическая. – 1973. – Т.37, №4. – С. 747-752.
82. Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любицкий О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. Ингибирование сывороточными антиоксидантами окисления люминола в присутствии гемоглобина и пероксида водорода // Вопросы медицинской химии. – 1997. – Т.43, №2. – С. 87-92.
83. Навас М.Х., Хименец А.М., Асуэро А.Г. Определение восстановительной способности настоек семени канарского канареечника методом хемиллюминесценции // Журнал аналитической химии. – 2004. – Т.59, №1. С. 84-86.
84. Lissi E., Salim-Hanna M., Pascual C., Castillo M.D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements // Free Radical Biology and Medicine. – 1995. – V.18, №2. – P. 153-158.
85. Беляков В.А., Васильев Р.Ф., Федорова Г.Ф. Кинетика оксигемиллюминесценции и ее использование для анализа антиоксидантов // Кинетика и катализ. – 2004. Т.45, №3. – С. 355-362.
86. Большакова И.В., Лозовская Е.Л., Сапежинский И.И. Антиоксидантные свойства ряда экстрактов лекарственных растений // Биофизика. – 1997. – Т.42, №2. – С. 480-483.
87. Арзамасцев А.П., Шкарина Е.И., Максимова Т.В., Пахомов В.П., Никулина И.Н., Лозовская Е.Л., Чумакова З.В., Сапежинский И.И. Оценка показателей антиоксидантной активности препаратов на основе

- лекарственного растительного сырья // Химико-фармацевтический журнал. – 1999. – Т.33, №11. – С. 17-20.
88. Наумов В.В., Храпова Н.Г. Определение активности слабых антиоксидантов хемилюминесцентным методом // Кинетика и катализ. – 1984. – Т.25, №3. – С. 563-570.
89. Шарипов Г.Л., Казаков В.П., Толстиков Г.А. Химия и хемилюминесценция 1,2-диоксикетанов. – М.: Наука, 1990. – 288 с.
90. Письменский А.В., Психа Б.Л., Харитонов В.В. Кинетическая модель окисляемости метиллинолеата // Нефтехимия. – 2000. – Т.40, №2. – С. 123-129
91. Письменский А.В., Психа Б.Л., Харитонов В.В. Механизм и эффективность ингибирующего действия 1,3-ди(4-фениламинофенокси)-2-пропанола и 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенола при окислении метиллинолеата // Нефтехимия. – 2001. – Т.41, №5. – С. 377-383.
92. Ермилова Е.В., Кадырова Т.В., Краснов Е.А., Писарева С.И., Пынченков В.И. Антиокислительная активность экстрактов водяники черной. // Химико-фармацевтический журнал. – 2000. – Т.34, №11. – С. 28-30.
93. Хасанов В.В., Дычко К.А., Рыжова Г.Л. Кинетический метод свободно-радикального окисления сульфит-иона для определения антиоксидантов в биообъектах // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. Т.35, №12. С. 36-37.
94. Наумов В.В., Васильев Р.Ф. Анти- и прооксидантное действие токоферола // Кинетика и катализ. – 2003. Т.44, №1. – С. 111-115.
95. Сизова Н.В., Веретникова О.Ю., Ефремов А.А. Оценка антиоксидантной активности эфирных масел методом микрокалориметрии // Химия растительного сырья. 2002. №3. С. 57-60.
96. Афанасьев В.А., Заиков Г.Е. Физические методы в химии. М.: Наука, 1984. – 174 с

97. Починюк Т.В., Тараховский М.Л., Портнягина В.А., Денисова М.Ф., Вонсяцкий В.А., Александрова А.Н., Мельничук В.А. Экспресс-метод определения антиокислительной активности лекарственных веществ // Химико-фармацевтический журнал. – 1985. – Т.19, №5. – С. 565-569.
98. Fogliano V., Verde V., Randazzo G., Ritieni A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines // Journal Agricultural and Food Chemistry. – 1999. – V.47, №3. – P. 1035-1040.
99. Singleton V.L., Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents // American Journal of Enology and Viticulture. – 1965. – V.16, №3. – P. 144-158.
100. Методы оценки антиоксидантной активности биологически активных веществ лечебного и профилактического назначения / Сборник докладов. М.: Изд-во РУДН, 2005. – 221 с.
101. Benzie I.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay // Analytical Biochemistry. – 1996. – V.239, №1. P. 70-76.
102. Moyer R.A., Hummer K.E., Finn C.E., Frei B., Wrolstad R.E. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: vaccinium, rubus, and ribes // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002. V.50, №3. P. 519-525.
103. Luximon-Ramma A., Bahorun T., Soobrattee M.A., Aruoma O.I. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula* // Journal Agricultural and Food Chemistry. – 2002. V.50, №18. P. 5042-5047.
104. Абдуллин И.Ф., Турова Е.Н., Будников Г.К., Зиятдинова Г.К., Гайсина Г.Х. Электрогенерированный бром – реагент для определения антиоксидантной способности соков и экстрактов // Заводская лаборатория. 2002. Т.68, №9. С. 12-15.

105. Абдуллин И.Ф., Турова Е.Н., Гайсина Г.Х., Будников Г.К. Применение электрогенерированного брома для оценки интегральной антиоксидантной способности лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе // Журнал аналитической химии. – 2002. – Т.57, №6. – С. 666-670.
106. Абдуллин И.Ф., Зиятдинова Г.К., Будников Г.К. Интегральная антиоксидантная емкость крови по данным метода гальваностатической кулонометрии // Вестник Татарского отделения Российской экологической академии. 2003. №3. – С. 35-39.
107. Ziyatdinova G.K., Budnikov H.C., Pogorel'tzev V.I. Electrochemical determination of the total antioxidant capacity of human plasma // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2005. – V.381, №8. – P. 1546-1551.
108. Зиятдинова Г.К. Электрохимические методы оценки интегральной антиоксидантной емкости медико-биологических объектов. - Дисс. канд. хим. наук. – Казань, 2005. - 187с.
109. Зиятдинова Г.К., Будников Г.К. Реакции супероксид анион-радикала с антиоксидантами и их применение в вольтамперометрии // Журнал аналитической химии. – 2005. – Т.60, № 5. – С. 56-59.
110. Брайнина Х.З., Иванова А.В., Шарафутдинова Е.Н. Оценка антиоксидантной активности пищевых продуктов методом потенциометрии // Известия ВУЗов. Пищевая технология.- 2004.- №4-с.73-75
111. Шарафутдинова Е.Н. Потенциометрия в исследовании антиоксидантной активности объектов растительного происхождения. Автореф. дис. канд. хим. наук. - Екатеринбург, 2007. - 24с.
112. Brainina Kh. Z., Ivanova A.V., Sharafutdinova E.N, Lozovskaya E.L., Shkarina E.I. Potentiometry as a method of antioxidant activity investigation // Talanta.- 2007.- Vol. 71, N 1.- P.13-18.

113. Цюпко Т.Г., Воронова О.Б, Перекотий В.В., Темердашев З.А, Храпко Н.В., Крутых Н.Е., Кондарева А.Ю., Переверзева Е.В. Оценка качества коньяка по обобщающим показателям / Материалы II Всер. Конф.: Аналитика России. 7-12 октября 2007. – Краснодар. 2007. – с.475.
114. Chevion S., Berry E.M., Kitrossky N., Kohen R. Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry // Free Radical Biology And Medicine – 1997. – V.22, №6. – P. 411-421.
115. Chevion S., Roberts M.A., Chevion M. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity // Free Radical Biology And Medicine. – 2000. – V.28, №6. – P. 860-870
116. Kohen R., Vellaichamy E., Hrbac J., Gati I., Nirosh O., Quantification of the overall reactive oxygen species scavenging capacity of biological fluids and tissues // Free Radical Biology And Medicine – 2000. – V.28, №6. – P. 871-879.
117. Яшин А.Я., Яшин Я.И., Новый прибор для определения антиоксидантной активности пищевых продуктов, биологическиактивных добавок, растительных лекарственных экстрактов и напитков // Приборы и автоматизация. – 2004. №11. С. 45-48.
118. Яшин А.Я., Яшин Я.И., Черноусова Н.И., Пахомов В.П., Экспрессный электрохимический метод определения антиоксидантной ативности пищевых продуктов // Пиво и напитки. – 2004. №6. С. 44-46.
119. Hitchman M.L., Measurement of dissolved oxygen. – Geneva.: John Wiley&Sons Inc., 1978. – 255 p.
120. Будников Г.К., Майстренко В.Н., Вяселев М.Р. Основы современного электрохимического анализа –М.: Мир, 2003, 592 с.
121. Осина М.А., Богдановская В.А., Тарасевич М.Р. Биоамперометрическое определение производных фенола с использованием композита лакказанафион // Электрохимия. 2003. Т.39, №4. С. 450-456.

122. Ge B., Lisdat F. Superoxide sensor based on cytochrome C immobilized on mixed-thiol SAM with a new calibration method // *Analytica Chimica Acta.* – 2002. – V.454, №1. – P. 53-64.
123. Ignatov S., Shishniashvili D., Ge B., Scheller F.W., Lisdat F. Amperometric biosensor based on a functionalized gold electrode for detection of antioxidants // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2002. – V.17, № 3. – P. 191-199.
124. Campanella L., Favero G., Persi L., Tomassetti M. New biosensor for superoxide radical used to evidence molecules of biomedical and pharmaceutical interest having radical scavenging properties // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* – 2000. – V.23, №1. – P. 69-76.
125. Campanella L., Bonanni A., Favero G., Tomassetti M. Determination of antioxidant properties of aromatic herbs, olives and fresh fruit using an enzymatic sensor // *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* – 2003. – V.375, № 8. P. 1011-1016.
126. Тара А.А., Лавиксар А.А., Тенно Т.Т. Определение активности оксидазы L-аминокислот с помощью преобразователя концентрации кислорода: Тез. докл. Всерос. Науч. конф. Электрохимические средства анализа и охрана окружающей среды. 25-27 июня 1989. – Тарту.: ТГУ. 1989. – с.146-147.
127. Бумбер А.А., Корниенко И.В., Профатилова И.А., Внуков В.В., Корниенко И.Е., Гарновский А.Д. Полярографический метод в изучении антиоксидантной активности аминокислот и белков. // *Журнал общей химии.* 2001. Т.71, №8. С. 1387-1390.
128. Громовая В.Ф., Шаповал Г.С., Луйк А.И. применение импульсной вольтамперометрии для изучения антиокислительной активности физиологическиактивных веществ // *Химико-фармацевтический журнал.* – 1994. Т.28, №11. – С. 11-14.

129. Громова В.Ф., Шаповал Г.С., Мионюк И.Е., Луйк А.И. Электрохимическое исследование антиоксидантной активности крови // Журнал общей химии. – 1997. – т.67, № 3. – С. 510-513.
130. Галюс З. Теоретические основы электрохимического анализа. М.: Мир, 1974. - 552. с.
131. Beyer R.E. The participation of coenzyme Q in free radical production and antioxidation // Free Radic. Biol. Med. – 1990. – Vol.8. – p. 545-565
132. Kagan V., Serbinova E., Packer L. Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 1990.– Vol. 169.– P. 851-857.
133. Tomasetti M., Littarru G.P., Stocker R., Alleva R. Coenzyme Q10 enrichment decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes // Free Radic. Biol. Med.– 1999.– Vol. 27.– P. 1027-1032.
134. Guo Q., Packer L. ESR studies of ascorbic acid-dependent recycling of the vitamin E homologue Trolox by coenzyme Q0 in murine skin homogenates // Redox Rep.– 1999.– Vol. 4.– P. 105-111
135. Stocker R., Bowry V.W., Frei B. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1991.– Vol. 88.– P. 1646-1650.
136. Ивановская Е. А. Определение аскорбиновой кислоты в биологических средах методом инверсионной вольтамперометрии. / Ивановская Е. А., Карпов Р. С.// Журнал аналитической химии. – 1997. – Т. 52. №7. – с. 773-774.
137. Пат. 2084885 Российская Федерация, G01N27/48. Способ количественного определения витаминов В1 и В2 в пищевых продуктах [Текст] / Анисимова А. С., Слипченко В. Ф., Филичкина О. Г., Пикула Н. П., Гордилова В. М., Слипченко Г. Б.; заявитель патентообладатель томский Политехнический Университет. - №95114897/13; заявл. 17.08.1995.; опубл. 20.07.1997.

138. Xue Liang Niu. Voltammetric Determination of Hyaluronic Acid Based on Its Interaction with Phenosafranine / Xue Liang Niu, Wei Sun, Kui Jiao// Russian Journal of Electrochemistry. – 2009. – Vol. 45. №8. pp. 967-972.
139. Е.И. Короткова. Планирование и организация эксперимента. Учебное пособие. Томск: Изд-во ТПУ, 2003, 92с.
140. А. А. Ясников. Механизмы сопряжения одно- и двухэлектронных реакций в химических и биологических процессах/А. А. Ясников, Н. В. Самусь, А. Б. Узиенко, И. Н. Мищенко// Теоретическая и экспериментальная химия – 1999. – Том 35(3) – стр. 133-144

## Оценка показателей прецизионности (повторяемости и воспроизводимости) методики анализа

### 1.1 Оценка показателя повторяемости методики анализа

1.1.1 Рассчитывают среднее арифметическое  $X_{ml}$  и выборочную дисперсию  $S_{ml}^2$  результатов единичного анализа содержания компонента в  $m$ -м ОО, полученных в условиях повторяемости (параллельных определений):

$$X_{ml} = \frac{\sum_{i=1}^N X_{mli}}{N}, \quad (1)$$

$$S_{ml}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (X_{mli} - X_{ml})^2}{N-1}, \quad (2)$$

$$m = 1, \dots, M; l = 1, \dots, L.$$

1.1.2 На основе полученных значений выборочных дисперсий проверяют гипотезу о равенстве генеральных дисперсий, используя критерий Кохрена.

Значение критерия Кохрена  $G_{m(\max)}$  рассчитывают по формуле

$$G_{m(\max)} = \frac{(S_{ml}^2)_{\max}}{\sum_{l=1}^L S_{ml}^2} \quad (3)$$

и сравнивают его с табличным значением этого критерия  $G_{\text{табл}}$  для числа степеней свободы  $\nu = N-1$ , соответствующего максимальной дисперсии, и  $f = L$ , соответствующего числу суммируемых дисперсий, и принятой доверительной вероятности  $P = 0,95$  (значения  $G_{\text{табл}}$ ).

Если  $G_{m(\max)} > G_{\text{табл}}$ , то соответствующее  $(S_{ml}^2)_{\max}$  из дальнейших расчетов исключают и процедуру повторяют до следующего по значению  $S_{ml}^2$  и т.д. до тех пор, пока  $G_{m(\max)}$  не станет меньше либо равно  $G_{\text{табл}}$ .

1.1.3 Не исключенные из расчетов  $S_{ml}^2$  считают однородными и по ним оценивают средние квадратические отклонения (далее - СКО), характеризующие повторяемость результатов единичного анализа

(параллельных определений), полученных для содержания, соответствующего содержанию компонента в  $m$ -м ОО. Эти СКО -  $S_{rm}$  рассчитывают по формуле

$$S_{rm} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L S_{ml}^2}{L}}, \quad (4)$$

где в числе слагаемых нет отброшенных значений.

1.1.4 Показатель повторяемости методики анализа в виде СКО повторяемости -  $\sigma_{rm}$  для содержания, соответствующего содержанию компонента в  $m$ -м ОО, устанавливают, принимая равным  $S_{rm}$

$$\sigma_{rm} \approx S_{rm}. \quad (5)$$

1.1.5 Показатель повторяемости методики анализа в виде предела повторяемости\* -  $r_{nm}$  для содержания, соответствующего содержанию компонента в  $m$ -м ОО, рассчитывают по формуле

$$r_{nm} = Q(P, n)\sigma_{rm}, \quad (6)$$

где  $n$  - число параллельных определений, предусмотренных методикой анализа для получения результата анализа,  $Q(P, n) = 3,31$  при  $n = 3$ ,  $P = 0,95$ ;

## 1.2 Оценка показателя воспроизводимости методики анализа

1.2.1 Рассчитывают выборочное СКО результатов анализа  $m$ -го ОО, полученных в условиях воспроизводимости, -  $S_{Rm}$  по формуле

$$S_{Rm} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L (X_{ml} - X_m)^2}{L-1} + \left(\frac{1}{n} - \frac{1}{N}\right) S_{rm}^2}, \quad m = 1, \dots, M, \quad (7)$$

где  $X_m$  - общее среднее значение результатов анализа, полученных в условиях воспроизводимости.

$X_m$  рассчитывают по формуле

$$X_m = \frac{\sum_{l=1}^L X_{ml}}{L}, \quad (8)$$

### 1.2.2 Оценка показателя воспроизводимости методики анализа

Показатель воспроизводимости методики анализа в виде СКО воспроизводимости -  $\sigma_{Rm}$  для содержания, соответствующего содержанию компонента в  $m$ -м ОО, устанавливают, принимая равным  $S_{Rm}$ :

$$\sigma_{Rm} \approx S_{Rm}. \quad (9)$$

Показатель воспроизводимости методики анализа в виде предела воспроизводимости\* -  $R_m$  для содержания, соответствующего содержанию компонента в  $m$ -м ОО, рассчитывают по формуле

$$R_m = Q(P, 2) \sigma_{Rm}, \quad (10)$$

где  $Q(P, 2) = 2,77$  при  $P = 0,95$ .

Значение предела воспроизводимости используют при проверке приемлемости результатов анализа, полученных в условиях воспроизводимости.

Примечание - В случае невозможности организации эксперимента в разных лабораториях экспериментальные данные получают в одной лаборатории в условиях внутрилабораторной прецизионности (серии результатов единичного анализа получают в разное время, разные операторы, используя разные партии реактивов одного типа, разные наборы мерной посуды и т.п.). Результаты единичного анализа внутри каждой серии получают в условиях повторяемости. В этом случае показатель воспроизводимости методики анализа в виде СКО рассчитывают по формуле

$$\sigma_{Rm} \approx k S_{R,m} \quad (11)$$

где  $S_{R,m}$  - выборочное СКО результатов анализа, рассчитанное в соответствии с 1.2.1 на основе результатов, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности;

$k$  - коэффициент, учитывающий условия проведения эксперимента.  $k$  может принимать значения от 1,2 до 2,0.

### 1.3 Оценка показателя правильности методики анализа

1.3.1 Рассчитывают оценку математического ожидания систематической погрешности методики анализа -  $\Theta_m$  как разность между средним значением результатов анализа  $X_m$  и аттестованным значением  $m$ -го ОО (СО или АС) -  $C_m$

$$\Theta_m = X_m - C_m, \quad m = 1, \dots, M. \quad (12)$$

1.3.2 Проверяют значимость вычисленных значений  $\Theta_m$  по критерию Стьюдента. Для этого рассчитывают значение  $t$ -критерия для  $m$ -го ОО -  $t_m$ :

$$t_m = \frac{|\Theta_m|}{\sqrt{\frac{S_m^2}{L} + \frac{\Delta_{om}^2}{3}}}, \quad (13)$$

где  $S_m^2 = \frac{\sum_{l=1}^L (X_{ml} - X_m)^2}{L-1}$  - дисперсия, характеризующая разброс средних арифметических значений результатов единичного анализа  $X_{ml}$ , полученных в  $l$ -й лаборатории, относительного среднего значения результатов анализа  $X_m$ ;

$\Delta_{om}$  - погрешность аттестованного значения.

1.3.3 Полученное значение  $t_m$  сравнивают с  $t_{\text{табл}}$  при числе степеней свободы  $f = L - 1$  для доверительной вероятности  $P = 0,95$ .

1.3.4 Если  $t_m \leq t_{\text{табл}}$ , то оценка систематической погрешности незначима на фоне случайного разброса, и в этом случае ее принимают равной нулю ( $\Theta_m = 0$ ).

1.3.5 Если  $t_m > t_{\text{табл}}$ , то оценка систематической погрешности значима на фоне случайного разброса и для принятия решения о приемлемости методики анализа вводят еще один дополнительный критерий:

$$|\Theta_m| \leq \xi \sigma_{\text{РМ}},$$

где  $\xi$  может принимать значения от 0,5 до 1 в зависимости от используемых в методике анализа метода, условий, средств измерений и т.п., а также характеристик объекта анализа.

При выполнении данного критерия может быть принято решение о введении в результаты анализа, получаемые при реализации данной методики, поправки на значение  $\Theta$ , т.е. значение  $\Theta$ , соответствующее содержанию  $C - \Theta(C)$ , вычитают из любого результата анализа, полученного по методике.

Если данный критерий не выполняется, принимают решение о доработке методики.

1.3.6 При незначимости  $\Theta$  или при принятом для методики анализа решении о введении в результаты анализа поправки показатель правильности методики анализа [верхнюю ( $\Delta_{с.в.м}$ ) и нижнюю ( $\Delta_{с.н.м}$ ) границы, в которых неисключенная систематическая погрешность методики анализа (для содержания, соответствующего содержанию определяемого компонента в  $m$ -м ОО) находится с принятой вероятностью  $P=0,95$  рассчитывают по формуле

$$\Delta_{с.в.м} = |\Delta_{с.н.м}| = \Delta_{с.м} = 1,96 * \sqrt{\frac{S_m^2}{L} + \frac{\Delta_{см}^2}{3}} = 1,96\sigma_{с.м}. \quad (14)$$

#### 1.4 Оценка показателя точности методики анализа

Верхнюю ( $\Delta_{в.м}$ ) и нижнюю ( $\Delta_{н.м}$ ) границы, в которых погрешность результата анализа\* (для содержания, соответствующего содержанию определяемого компонента в  $m$ -м ОО) находится с принятой вероятностью  $P=0,95$ , рассчитывают по формуле

$$\Delta_{в.м} = |\Delta_{н.м}| = \Delta_m = 1,96\sqrt{\sigma_{Рм}^2 + \sigma_{с.м}^2} = 1,96\sigma_m(\Delta). \quad (15)$$

Примечания

1. Здесь и далее: при выполнении условия  $\frac{\Delta_{с.м}}{\sigma_{Рм}} < 0,8$

показатель точности методики анализа может быть рассчитан по формуле

$$\Delta_{в(н)т} = \pm 1,96\sigma_{т} . \quad (16)$$

2. В случае, если учет  $\Theta(C)$  при вычислении показателя правильности методики анализа

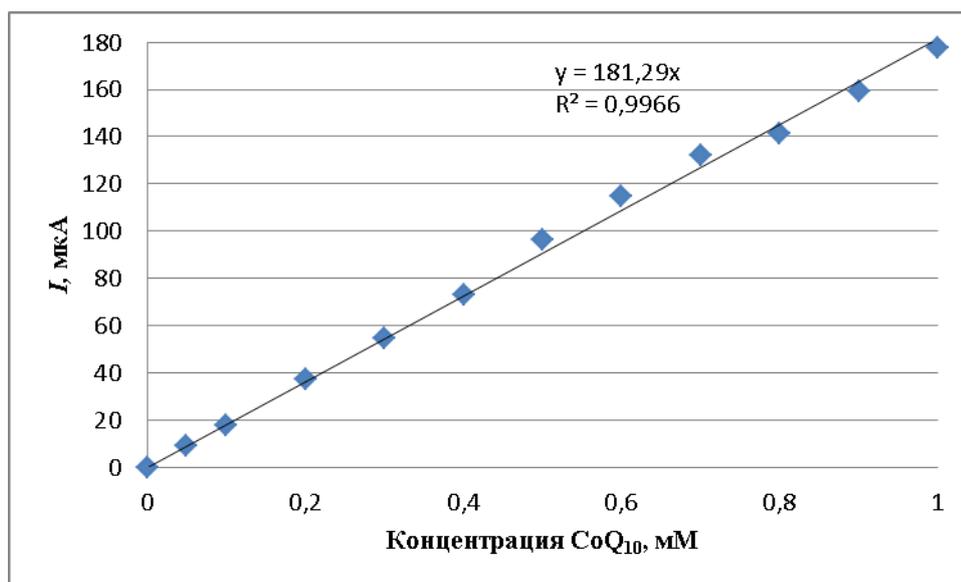
$$\Delta_{с.в(н)т} = \Theta_{т} \pm 1,96\sigma_{с,т} , \quad (17)$$

где  $\Delta_{с.в(н)т}$  - верхняя и нижняя границы, в которых систематическая погрешность методики анализа находится с принятой вероятностью  $P = 0,95$ , не приводит к превышению приписанной характеристики погрешности результата анализа над нормой погрешности, поправку в результат на значение  $\Theta(C)$  можно не вносить.

В этом случае показатель точности методики анализа (для содержания, соответствующего содержанию определяемого компонента в  $m$ -м ОО) рассчитывают по формуле

$$\Delta_{в(н)т} = \Theta_{т} \pm 1,96\sigma_{т}(\Delta) , \quad (18)$$

Для оценки метрологических показателей вольтамперометрической методики определения коэнзима  $Q_{10}$  в продукции фармацевтической и косметической промышленности была выбрана прямолинейная область градуировочной зависимости тока электроокисления коэнзима  $Q_{10}$  от его концентрации в электрохимической ячейке (рис.1)



**Рисунок 1.** График зависимости высоты тока окисления  $\text{CoQ}_{10}$  от его концентрации в электрохимической ячейке

### 1. Содержание $\text{CoQ}_{10}$ 0,05 мМ

Повторяемость:

Концентрация стандартного раствора $\text{CoQ}_{10}$ , мМ	Погрешность стандартного раствора, $\Delta_0$ , мМ	Номер серии, L = 15	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое)	$S^2_L$
			1	2		
0,05	0,0017	1	6,92426E-05	6,55635E-05	6,74031E-05	6,76821E-12
		2	5,63021E-05	5,02179E-05	5,326E-05	1,85086E-11
		3	6,06046E-05	6,78526E-05	6,42286E-05	2,62672E-11
		4	6,71024E-05	7,04617E-05	6,87821E-05	5,64231E-12
		5	6,42837E-05	6,23587E-05	6,33212E-05	1,85299E-12
		6	5,85526E-05	6,60875E-05	6,232E-05	2,83873E-11
		7	6,42837E-05	7,00701E-05	6,71769E-05	1,67407E-11
		8	5,49617E-05	5,63352E-05	5,56484E-05	9,43237E-13
		9	6,79354E-05	5,81775E-05	6,30564E-05	4,76078E-11
		10	7,28943E-05	7,16366E-05	7,22654E-05	7,90846E-13
		11	6,43058E-05	5,50885E-05	5,96972E-05	4,24791E-11
		12	6,79298E-05	7,51007E-05	7,15153E-05	2,57104E-11
		13	6,12554E-05	5,90656E-05	6,01605E-05	2,39775E-12
		14	5,63462E-05	6,06046E-05	5,84754E-05	9,06686E-12
		15	6,35225E-05	6,1785E-05	6,26538E-05	1,50954E-12

$S^2_{\max}$	$\Sigma S^2$	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	Показатель повторяемости $S_r$ в конкретной лаборатории
4,76078E-11	2,34673E-10	0,20286884	0,471	3,95536E-06
				СКО повторяемости $\sigma^*_{r} = S_r = 3,95536E-06$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	6,33309E-05
СКО в условиях промежуточной прецизионности	$\sigma^*_{Rл} = S_{Rл} = 5,46114E-06$

Оценивание систематической погрешности $\theta^*$	1,33309E-05
Значимость по критерию Стьюдента	
t расчетное	8,306280623
t табличное для 14 серий	2,0930
$\sigma^*_c$	1,60492E-06

Так как  $t_{\text{расч}} > t_{\text{табл}}$ , делаем вывод, что оценка систематической погрешности лаборатории значима на фоне случайного разброса и учитываем ее при дальнейших расчетах:

Границы, в которых находится не исключенная погрешность
$\Delta_{\text{в.с}}^* = \Delta_{\text{н.с}} =  \Delta_{\text{с}}^*  = 1,64766\text{E-}05$
$\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 2,44874\text{E-}05$

$\sigma_{\text{r}}^* \%$	$\sigma_{\text{R}}^* \%$	$\pm \Delta_{\text{с}}^* \%$	$\pm \Delta^* \%$
<b>8</b>	<b>11</b>	<b>33</b>	<b>49</b>

## 2. Содержание СоQ<sub>10</sub> 0,1 мМ

Повторяемость:

Концентрация стандартного раствора СоQ <sub>10</sub> , мМ	Погрешность стандартного раствора, $\Delta_0$ , мМ	Номер серии, L = 15	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое)	$S^2_{\text{L}}$
			1	2		
0,1	0,0034	1	0,000111854	0,000117022	0,000114438	1,33568E-11
		2	9,9818E-05	0,000112356	0,000106087	7,85998E-11
		3	0,000123123	0,000134122	0,000128623	6,04885E-11
		4	0,000113729	0,00010684	0,000110285	2,37327E-11
		5	0,000116013	0,000116515	0,000116264	1,25981E-13
		6	0,000128253	0,00012496	0,000126607	5,42214E-12
		7	0,000112334	0,00011229	0,000112312	9,73649E-16
		8	0,000126797	0,00011154	0,000119168	1,16393E-10
		9	9,60616E-05	0,000101142	9,86017E-05	1,29045E-11
		10	0,000112317	0,000112091	0,000112204	2,55735E-14
		11	0,000107072	0,000109653	0,000108362	3,33207E-12
		12	9,5532E-05	8,99939E-05	9,2763E-05	1,53352E-11
		13	9,49584E-05	0,000100165	9,75619E-05	1,35571E-11
		14	8,99774E-05	8,65133E-05	8,82454E-05	5,99987E-12
		15	0,000125203	0,000112334	0,000118768	8,28041E-11

$S^2_{\text{max}}$	$\Sigma S^2$	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	Показатель повторяемости $S_r$ в конкретной лаборатории
1,16393E-10	4,32078E-10	0,269379386	0,471	5,36705E-06
				СКО повторяемости $\sigma_{\text{r}}^* = S_r = 5,36705\text{E-}06$

## Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	0,000110019
СКО в условиях промежуточной прецизионности	$\sigma^*_{Rл} = S_{Rл} = 1,17283E-05$

Оценивание систематической погрешности $\theta^*$	1,00193E-05
Значимость по критерию Стьюдента	
t расчетное	2,758294517
t табличное для 14 серий	2,0930
$\sigma^*_c$	3,63243E-06

Так как  $t_{расч} > t_{табл}$ , делаем вывод, что оценка систематической погрешности лаборатории значима на фоне случайного разброса и учитываем ее при дальнейших расчетах:

Границы, в которых находится не исключенная погрешность
$\Delta^*_{в,с} = \Delta^*_{н,с} =  \Delta^*_c  = 1,71389E-05$
$\Delta^*_в = \Delta^*_н = \Delta^* = 3,4084E-05$

## С учетом систематической погрешности:

$\sigma^*_r$ %	$\sigma^*_R$ %	$\pm \Delta^*_c$ %	$\pm \Delta^*$ %
<b>5</b>	<b>11</b>	<b>17</b>	<b>34</b>

3. Содержание  $CoQ_{10}$  0,4 мМ

## Повторяемость:

Концентрация стандартного раствора $CoQ_{10}$ , мМ	Погрешность стандартного раствора, $\Delta_0$ , мМ	Номер серии, L = 15	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое)	$S^2_L$
			1	2		
0,4	0,0013	1	0,000415235	0,000431436	0,000423336	1,31229E-10
		2	0,000414231	0,000404705	0,000409468	4,5374E-11
		3	0,000443053	0,000420955	0,000432004	2,44143E-10
		4	0,000417111	0,000432285	0,000424698	1,15134E-10
		5	0,000408362	0,000392316	0,000400339	1,28739E-10
		6	0,000393022	0,000417309	0,000405166	2,9493E-10
		7	0,000454327	0,000443251	0,000448789	6,13408E-11
		8	0,00041363	0,000425953	0,000419791	7,59257E-11
		9	0,000482183	0,000465199	0,000473691	1,44225E-10

		10	0,000388118	0,000415472	0,000401795	3,7412E-10
		11	0,000476645	0,000495775	0,00048621	1,8297E-10
		12	0,000426493	0,000404407	0,00041545	2,43899E-10
		13	0,000431436	0,000458707	0,000445071	3,7186E-10
		14	0,000476099	0,000456087	0,000466093	2,00243E-10
		15	0,000428584	0,000448811	0,000438698	2,04571E-10

$S^2_{\max}$	$\Sigma S^2$	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	Показатель повторяемости $S_r$ в конкретной лаборатории
3,7412E-10	2,8187E-09	0,132727539	0,471	1,37082E-05
				СКО повторяемости $\sigma^*_r = S_r = 1,37082E-05$

### Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	0,000432707
СКО в условиях промежуточной прецизионности	$\sigma^*_{Rл} = S_{Rл} = 2,25021E-06$

Оценивание систематической погрешности $\theta^*$	2,6757E-05
Значимость по критерию Стьюдента	
t расчетное	3,088850874
t табличное для 14 серий	2,0930
$\sigma^*_c$	1,05886E-05

Так как  $t_{\text{расч}} > t_{\text{табл}}$ , делаем вывод, что оценка систематической погрешности лаборатории значима на фоне случайного разброса и учитываем ее при дальнейших расчетах:

Границы, в которых находится не исключенная погрешность
$\Delta^*_{в,с} = \Delta_{н,с} =  \Delta^*_c  = 5,34604E-05$
$\Delta^*_в = \Delta^*_н = \Delta^* = 8,91076E-05$

С учетом систематической погрешности:

$\sigma^*_r$ %	$\sigma^*_R$ %	$\pm \Delta^*_c$ %	$\pm \Delta^*$ %
3,5	7	13	22

### 4. Содержание $\text{CoQ}_{10}$ 0,6 $\mu\text{M}$

## Повторяемость:

Концентрация стандартного раствора $Co_{Q_{10}}$ , мМ	Погрешность стандартного раствора, $\Delta_0$ , мМ	Номер серии, $L = 15$	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое)	$S^2_L$
			1	2		
0,6	0,002	1	0,000606211	0,000630002	0,000618106	2,82997E-10
		2	0,000555784	0,000558249	0,000557016	3,03975E-12
		3	0,000658073	0,000685758	0,000671915	3,83228E-10
		4	0,000748469	0,000726185	0,000737327	2,48305E-10
		5	0,000652661	0,000638193	0,000645427	1,04669E-10
		6	0,000621402	0,000674968	0,000648185	1,43466E-09
		7	0,000639164	0,000580368	0,000609766	1,72844E-09
		8	0,000630564	0,000652684	0,000641624	2,44631E-10
		9	0,000635766	0,00065842	0,000647093	2,56609E-10
		10	0,000654311	0,000685758	0,000670034	4,94452E-10
		11	0,000630862	0,000667555	0,000649208	6,73173E-10
		12	0,000707965	0,000630597	0,000669281	2,99288E-09
		13	0,000618153	0,000658409	0,000638281	8,1027E-10
		14	0,00068573	0,000645452	0,000665591	8,11159E-10
		15	0,000592007	0,000564383	0,000578195	3,8155E-10

$S^2_{\max}$	$\Sigma S^2$	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	Показатель повторяемости $S_r$ в конкретной лаборатории
2,99288E-09	1,08501E-08	0,275840013	0,471	2,68949E-05
				СКО повторяемости $\sigma^*_r = S_r = 2,68949E-05$

## Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	0,000643137
СКО в условиях промежуточной прецизионности	$\sigma^*_{R_{л}} = S_{R_{л}} = 4,23376E-05$

Оценивание систематической погрешности $\theta^*$	4,31368E-05
Значимость по критерию Стьюдента	
t расчетное	2,652999727
t табличное для 14 серий	2,0930
$\sigma^*_c$	1,62596E-05

Так как  $t_{\text{расч}} > t_{\text{табл}}$ , делаем вывод, что оценка систематической погрешности лаборатории значима на фоне случайного разброса и учитываем ее при дальнейших расчетах:

Границы, в которых находится не исключенная погрешность	
$\Delta^*_{в,с} = \Delta_{н,с} =  \Delta^*_c  = 7,50056E-05$	
$\Delta^*_в = \Delta^*_н = \Delta^* = 0,000132028$	

С учетом систематической погрешности:

$\sigma^*_{r} \%$	$\sigma^*_{R} \%$	$\pm \Delta^*_{c} \%$	$\pm \Delta^* \%$
5	7	12	22

## 5. Содержание CoQ<sub>10</sub> 0,8 мМ

Повторяемость:

Концентрация стандартного раствора CoQ <sub>10</sub> , мМ	Погрешность стандартного раствора, $\Delta_0$ , мМ	Номер серии, L = 15	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое)	$S^2_L$
			1	2		
0,8	0,0027	1	0,000942142	0,000952645	0,000947394	5,51514E-11
		2	0,000823057	0,000798726	0,000810891	2,96003E-10
		3	0,000840113	0,000861653	0,000850883	2,31987E-10
		4	0,000794385	0,000818048	0,000806217	2,79986E-10
		5	0,000858315	0,00088145	0,000869883	2,67596E-10
		6	0,000800954	0,000829638	0,000815296	4,11367E-10
		7	0,000810922	0,000841993	0,000826458	4,82727E-10
		8	0,000914088	0,000939462	0,000926775	3,21913E-10
		9	0,000831011	0,000869866	0,000850439	7,54851E-10
		10	0,000898571	0,000859319	0,000878945	7,70361E-10
		11	0,000942164	0,000990154	0,000966159	1,15149E-09
		12	0,00090946	0,00086729	0,000888375	8,89155E-10
		13	0,000815274	0,000831348	0,000823311	1,29182E-10
		14	0,000886497	0,000906211	0,000896354	1,94326E-10
		15	0,00079599	0,000773352	0,000784671	2,56234E-10

$S^2_{\max}$	$\Sigma S^2$	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	Показатель повторяемости $S_r$ в конкретной лаборатории
1,15149E-09	6,49233E-09	0,177361846	0,471	2,08044E-05
				СКО повторяемости $\sigma^*_{r} = S_r = 2,08044E-05$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	0,000862803
СКО в условиях промежуточной прецизионности	$\sigma^*_{Rл} = S_{Rл} = 5,44156E-05$

Оценивание систематической погрешности $\theta^*$	6,28032E-05
Значимость по критерию Стьюдента	
t расчетное	2,944379503
t табличное для 14 серий	2,0930
$\sigma_c^*$	2,13299E-05

Так как  $t_{расч} > t_{табл}$ , делаем вывод, что оценка систематической погрешности лаборатории значима на фоне случайного разброса и учитываем ее при дальнейших расчетах:

Границы, в которых находится не исключенная погрешность
$\Delta_{в,с}^* = \Delta_{н,с} =  \Delta_c^*  = 0,00010461$
$\Delta_{в}^* = \Delta_{н}^* = \Delta^* = 0,000177359$

С учетом систематической погрешности:

$\sigma_r^* \%$	$\sigma_R^* \%$	$\pm \Delta_c^* \%$	$\pm \Delta^* \%$
<b>3</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>22</b>

## 6. Содержание $CoQ_{10}$ 1мМ

Повторяемость:

Концентрация стандартного раствора $CoQ_{10}$ , мМ	Погрешность стандартного раствора, $\Delta_0$ , мМ	Номер серии, L = 15	Результаты параллельного определения		Результат измерения (среднее арифметическое)	$S_L^2$
			1	2		
1	0,034	1	0,001022235	0,001088427	0,001055331	2,19071E-09
		2	0,001094186	0,0010225	0,001058343	2,56946E-09
		3	0,001000171	0,001021926	0,001011049	2,36644E-10
		4	0,00096734	0,000989139	0,000978239	2,37605E-10
		5	0,00103351	0,000994854	0,001014182	7,47155E-10
		6	0,001088427	0,001050014	0,001069221	7,37802E-10
		7	0,001023151	0,001049407	0,001036279	3,44696E-10
		8	0,000996735	0,000981582	0,000989158	1,14799E-10
		9	0,00104062	0,000989139	0,001014879	1,32515E-09
		10	0,000950792	0,000983838	0,000967315	5,46036E-10
		11	0,000995207	0,001020205	0,001007706	3,12466E-10
		12	0,001024243	0,00105147	0,001037856	3,70657E-10
		13	0,001051652	0,000996828	0,00102424	1,50282E-09
		14	0,001038193	0,001060753	0,001049473	2,54489E-10
		15	0,001016372	0,001045954	0,001031163	4,3756E-10

$S_{max}^2$	$\Sigma S^2$	$G_{расч}$	$G_{табл}$	Показатель повторяемости $S_r$ в конкретной лаборатории
2,56946E-09	1,1928E-08	0,215413176	0,471	2,81993E-05
				СКО повторяемости $\sigma_r^* = S_r = 2,81993E-05$

**Внутрилабораторная прецизионность:**

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	0,001022962
СКО в условиях промежуточной прецизионности	$\sigma^*_{Rл} = S_{Rл} = 2,97212E-05$

Оценивание систематической погрешности $\theta^*$	2,29623E-05
Значимость по критерию Стьюдента	
t расчетное	1,069080849
t табличное для 14 серий	2,0930
$\sigma^*_c$	2,14785E-05

Границы, в которых находится не исключенная погрешность
$\Delta^*_{в,с} = \Delta^*_{н,с} =  \Delta^*_c  = 4,20979E-05$
$\Delta^*_в = \Delta^*_н = \Delta^* = 7,18729E-05$

$\sigma^*_r$ %	$\sigma^*_R$ %	$\pm \Delta^*_c$ %	$\pm \Delta^*$ %
<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>7</b>

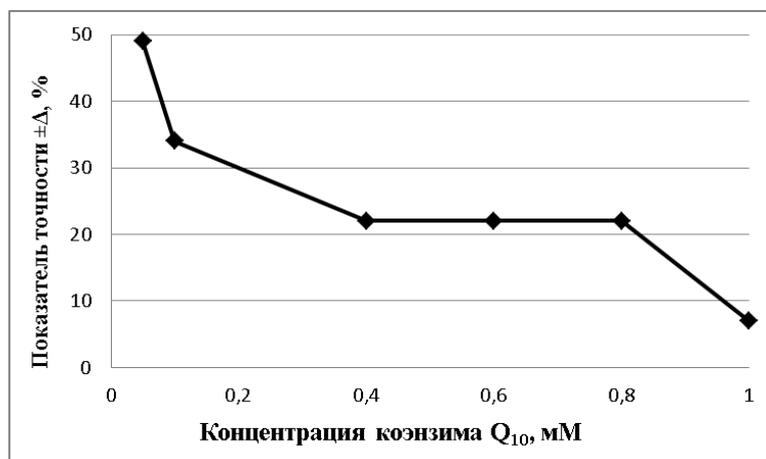
Обобщаем полученные данные для всего диапазона определяемых концентраций:

Концентрация CoQ <sub>10</sub> , См, мМ	$\sigma^*_r$	$\sigma^*_R$	$\pm \Delta^*_c$	$\pm \Delta^*$
<b>0.05</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>33</b>	<b>49</b>
<b>0,1</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>17</b>	<b>34</b>
<b>0,4</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>22</b>
<b>0,6</b>	<b>4,5</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>22</b>
<b>0,8</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>22</b>
<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>7</b>

Из данных таблицы видно, что при определении коэнзима Q<sub>10</sub> вольтамперометрическим методом показатель точности не превышает 49 %, показатели повторяемости и воспроизводимости 8 и 11 %, соответственно.

При рассмотрении численных значений качественных показателей методики можно заметить, что идет возрастание значений показателя повторяемости

( $\sigma_r$ ), воспроизводимости ( $\sigma_R$ ), точности результатов измерения ( $\pm\Delta$ ) при возрастании концентрации коэнзима  $Q_{10}$  в ячейке.



**Рисунок 6.2.** Изменение показателя точности вольтамперометрической методики определения коэнзима  $Q_{10}$  в зависимости от его концентрации.

Изменение качественных характеристик МВИ не носит линейный характер, в таком случае интервал оценки, разбиваем на диапазоны и каждому диапазону приписываем количественные характеристики (табл. 6.6).

**Таблица 6.6.**

Диапазон измерений, значения показателей точности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности ( $p = 0.95$ ,  $n = 2$ ,  $l = 15$ )

Диапазон измерений, мМ	Показатели прецизионности (относительные значения)		Показатель точности (границы относительной погрешности при $P = 0.95$ ), $\pm\Delta$ , %
	Показатель повторяемости, $\sigma_r$ , %	Показатель воспроизводимости $\sigma_R$ , %	
От 0,05 до 0,1	8	11	50
От 0,1 до 0,4	5	11	35
От 0,4 до 1	4	7	22

Указанные выше показатели качества результатов анализа являются установленными характеристиками погрешности для совокупности результатов анализа, полученных при соблюдении требований методики при ее реализации в отдельной лаборатории. Таким образом, были установлены

рабочие условия для количественного определения содержания коэнзима  $Q_{10}$  в продукции фармацевтической и косметической промышленности. Найден диапазон линейной зависимости аналитического сигнала коэнзима  $Q_{10}$  от его концентрации, проверена гипотеза линейности градуировочной зависимости, оценена адекватность модели по критерию Фишера. Проведена оценка правильности методики методом «введено-найденно». Установлены основные метрологические характеристики разрабатываемой методики количественного определения содержания коэнзима  $Q_{10}$  в продукции фармацевтической и косметической промышленности (показатель точности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности).