

Министерство образования и науки Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Институт природных ресурсов
Направление подготовки: химическая технология
Кафедра физической и аналитической химии

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Определение коэнзима Q10 в биологически активных добавках методами вольтамперометрии и спектрофотометрии.

УДК

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ4Г	Мирошникова Дарья Дмитриевна		

Руководитель

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор каф. ФАХ	Короткова Е.И.	д.х.н., профессор		

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Креницына З.В.	к.т.н., доцент		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Шеховцова Н.С.	к.х.н., доцент		

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Зав. кафедрой	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
ФАХ ИПР	Пестряков А.Н.	д.х.н., профессор		

Томск – 2016 г.

Министерство образования и науки Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Институт природных ресурсов

Направление подготовки: химическая технология

Уровень образования: магистратура

Кафедра физической и аналитической химии

Период выполнения: весенний семестр 2015/2016 учебного года

Форма представления работы:

магистерская диссертация

(бакалаврская работа, дипломный проект/работа, магистерская диссертация)

КАЛЕНДАРНЫЙ РЕЙТИНГ-ПЛАН
выполнения выпускной квалификационной работы

Срок сдачи студентом выполненной работы:	31.05.2016г
--	-------------

Дата контроля	Название раздела (модуля) / вид работы (исследования)	Максимальный балл раздела (модуля)
21.04.2016г.	<i>Литературный обзор по теме</i>	20
14.05.2016г.	<i>Методики эксперимента</i>	30
20.05.2016г.	<i>Обсуждение результатов</i>	50

Составил преподаватель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор каф. ФАХ	Короткова Е.И.	д.х.н., профессор		

Согласовано:

Зав. кафедрой	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
ФАХ ИПР	Пестряков А.Н.	д.х.н., профессор		

Министерство образования и науки Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Институт природных ресурсов
Направление подготовки: химическая технология
Кафедра физической и аналитической химии

УТВЕРЖДАЮ:
Зав. кафедрой
_____ Пестряков А.Н.
(Подпись) (Дата) (Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ
на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

магистерской диссертации

(бакалаврской работы, дипломного проекта/работы, магистерской диссертации)

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ4Г	Мирошникова Дарья Дмитриевна

Тема работы:

Определение коэнзима Q10 в биологически активных добавках методами вольтамперометрии и спектрофотометрии.	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	№ 3358/с от 06.05.2016

Срок сдачи студентом выполненной работы:	31.05.2016
--	------------

Обозначения

Актуальность

История происхождения коэнзима Q10

Литературный обзор

1. Нормативные документы БАД
2. Физико-химические свойства коэнзима Q10
3. Биологическая роль в организме
 - 3.1 переносчик электронов
 - 3.2 антиоксидантная функция
4. методы определения (англ. Часть)
 - 4.1 ВЭЖХ
 - 4.2 Электрохимический
 - 4.3 Спектрофотометрический
5. Способы пробоподготовки биологических объектов
 - 5.1 Первичная
 - 5.2 Осаждение белков
 - 5.3 Экстракция
 - 5.4 Восстановление экстрагированных форм

Экспериментальная часть

1. Аппаратура, реактивы, электроды, ячейки, объекты исследования
2. Определение коэнзима Q10 вольтамперометрическим методом
 1. Аналитический сигнал
 - 1.1 влияние рН раствора на аналитический сигнал
 - 1.2 влияние веществ на аналитический сигнал
3. Определение коэнзима Q10 спектрофотометрическим методом
 - 1 влияние веществ на аналитический сигнал

Обсуждение результатов

Выводы

Список использованной литературы

Приложение А

Обозначения

CoQ10 – коэнзим Q10

БАД – биологически активные добавки

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

АТФ – аденозинтрифосфат

СУЭ – стеклоуглеродный электрод

ХСЭ – хлорсеребряный электрод

РПЭ – ртутно-пленочный электрод

ТФЭ – твердофазовая экстракция

ДГК - дигидрокверцетин

Убидекаренол – фармацевтическая субстанция коэнзима Q₁₀

Убихинол (CoQ₁₀H₂) – восстановленная форма коэнзима Q₁₀

Убихинон (CoQ₁₀) – окисленная форма коэнзима Q₁₀

ТУ – технические условия

Актуальность

Коэнзим Q10 - это жирорастворимое вещество, которое может синтезироваться в организме человека и поступает в организм вместе с пищей. В малом количестве содержится в продуктах. Коэнзим Q10 нельзя отнести к классу витаминов, относится к группе "убихинонов", от английского слова "ubiquinone", которое переводится как "повсеместный" – означает, что вещества входят в состав любого живого организма. Коэнзим Q10 в основном содержится в энергопродуцирующих структурах клеток, которые называются "митохондрии". Именно поэтому, максимальные концентрации коэнзима Q10 наблюдаются в органах с высокой энергетической потребностью - в сердце, почках, печени.

После 30-35 лет и при нарушении здоровья собственный синтез снижается. И это приводит к приему биологически активных добавок (БАД), в которых содержится CoQ10. Множество научных журналов опубликовывают данные, которые подтверждают прекрасное действие CoQ10. Его применяют для лечения многих заболеваний сердечно-сосудистой системы, пиелонефрита, онкологических заболеваний, а также комплексная терапия часто болеющих детей и пр. Нельзя также забывать о коже, коэнзим Q10, в виде крема, делает ее эластичной.

К качеству биологически активных добавок в настоящее время увеличивается ряд требований к их качеству, которые должны соответствовать критериям, а именно безопасности, качества, эффективности. Критерии строго регламентируются нормативными документами:

Таблица 1. Нормативные документы по БАД

Документ	Основное содержание
Приказ Минздрава РФ от 15.04.97	Определение БАД. Показания к

<p>№ 117 “О порядке экспертизы и гигиенической сертификации биологически активных добавок к пище” (утратил силу)</p>	<p>применению. Дозирование. Порядок экспертизы и гигиенической сертификации БАД к пище, место проведения экспертизы, порядок и уровень оформления документов.</p>
<p>Постановление Главного санитарного врача РФ от 15.09.97 № 21 “О государственной регистрации биологически активных добавок к пище” Утратило силу</p>	<p>Форма регистрационного удостоверения. Порядок предрегистрационной экспертизы</p>
<p>Постановление Правительства РФ от 23.04.97г. № 481 “Об утверждении Перечня товаров, информация о которых должна содержать противопоказания для применения при отдельных видах заболеваний”</p>	<p>Некоторые БАД относятся к продукции, информация о которой должна содержать противопоказания для применения при отдельных видах заболеваний</p>
<p>ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК К ПИЩЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ МУК 2.3.2.721-98</p>	<p>Требования, изложенные в настоящих Методических указаниях в отношении биологически активных добавок к пище, применяются на этапах экспертизы и регистрации биологически активных добавок к пище, а также при разработке и постановке их на производство, промышленном производстве, хранении, транспортировании,</p>

	<p>закупке, ввозе в страну и реализации (далее - при обращении БАД), при разработке нормативной и технической документации, регламентирующей вопросы обращения БАД.</p> <p>Определение нутрицевтиков, парафармацевтиков, эубиотиков.</p> <p>Функциональная роль.</p> <p>Экспериментальные и клинические испытания.</p> <p>Физиологические нормы потребления.</p>
<p>Приказ Минздрава РФ от 10.11.2000г. № 396 “О биологически активных веществах”</p>	<p>Департаменту государственного санитарно - эпидемиологического надзора осуществлять в соответствии с требованиями, предъявляемыми к биологически активным добавкам к пище (БАД), государственную регистрацию, надзор и контроль биологически активных веществ, предназначенных для производства БАД и использования в пищевой и парфюмерно - косметической промышленности.</p>
<p>Постановление Правительства РФ от 21 декабря 2000 г. N988 "О государственной регистрации</p>	<p>Биологически активные добавки подразделяются на нутрицевтики, парафармацевтики, пробиотики</p>

<p>новых пищевых продуктов, материалов и изделий" (в ред. Постановлений Правительства РФ от 27.04.2001 N324, от 14.01.2002 N11, от 11.02.2003 N90, от 26.01.2007 N50, от 26.02.2007 N130, от 10.03.2007 N149)</p> <p>Утратило силу</p>	
<p>Приказ Минздрава РФ от 15.08.2001г. № 325 «О санитарно-эпидемиологической экспертизе продукции» (утратил силу)</p> <p>Постановление главного государственного санитарного врача РФ №146 от 15.08.2003 «О санитарно-эпидемиологической экспертизе биологически активных добавок»</p>	<p>БАД подлежат санитарно-эпидемиологической экспертизе. Документом соответствия БАД к пище государственным санитарно-эпидемиологическим правилам и нормативам является санитарно-эпидемиологическое заключение.</p>
<p>Приказ № 2 Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «О государственной регистрации продукции, веществ, препаратов»</p> <p>На основании Приказа Минздрава РФ № 89 от 26.03.2001г. «О государственной регистрации новых пищевых продуктов...»</p>	<p>Выдается свидетельство о государственной регистрации БАД</p>

<p>СанПиН № 2.3.2.1078-01 “Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов” введены в действие Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 14.11.2001г. № 36 (ред. от 06.07.2011)</p>	<p>Устанавливают гигиенические нормативы безопасности и пищевой ценности для человека пищевых продуктов, а также требования по соблюдению указанных нормативов при изготовлении, ввозе и обороте пищевых продуктов.</p> <p>показателей безопасности, которые включает определение: токсических элементов (свинец, мышьяк, кадмий, ртуть); пестицидов (ДДТ и его метаболиты, гептахлор и др.); радионуклидов (цезий-137, стронций-90); микробиологических показателей (<i>E. coli</i>, <i>S. aureus</i>, сальмонеллы, дрожжи, плесени).</p>
<p>СанПиН № 2.3.2.1153-02 (дополнение №1 к СанПиН № 2.3.2.1078-01)</p>	<p>Содержит перечень растительного сырья, которое может оказать вредное воздействие на здоровье человека при использовании для создания БАД, а также списки растений, подлежащих включению в однокомпонентные БАД</p>

<p>Постановление Правительства РФ от 06.02.2002 N 81 (ред. от 04.10.2012) "О внесении изменений и дополнений в Правила продажи отдельных видов товаров и в перечень непродовольственных товаров надлежащего качества, не подлежащих возврату или обмену на аналогичный товар других размера, формы, габарита, фасона, расцветки или комплектации</p>	<p>Покупатель имеет право требовать от продавца удостоверение качества на БАД</p>
<p>«Руководство по методам контроля качества и безопасности БАД к пище» Р 4.1.1672-03</p>	<p>Руководство устанавливает методы контроля ингредиентного состава и показателей качества и безопасности биологически активных добавок к пище</p>
<p>“О рекламе” от 13.03.2006 г. №38-ФЗ (редакция 2013)</p>	<p>В старом законе не было отдельной статьи о БАД, по давалось определение ненадлежащей рекламы (недобросовестная, недостоверная, неэтичная, заведомо ложная и иная реклама, в которой нарушены требования к ее содержанию, времени, месту, способу распространения, установленных законодательством РФ). В новом законе в части, которая</p>

касается медицинской рекламы, главе III появилась отдельная статья 25, которая регламентирует “Рекламу биологически активных и пищевых добавок, продуктов детского питания”. В соответствии с ней, реклама биологически активных и пищевых добавок не должна: создавать впечатление, что объект рекламирования является лекарственным средством и (или) обладает лечебными свойствами, в том числе содержать образы медицинских (фармацевтических) работников; содержать ссылок на конкретные случаи излечения от заболеваний, улучшения состояния, удачного применения объекта рекламирования; содержать выражение благодарности физических лиц в связи с использованием объекта рекламирования; побуждать к отказу от здорового питания; ссылаться на результаты исследований, обязательных для государственной регистрации объекта рекламирования, а также

	использовать результаты иных исследований в форме прямой рекомендации к применению объекта рекламирования.
“О качестве и безопасности пищевых продуктов” от 2.01.2000 г. №29-ФЗ (редакция 2011).	Дал определение понятия “БАД”. Содержит общие требования к обеспечению качества и безопасности пищевых продуктов. Порядок государственной регистрации,
Закон РФ от 07.02.1992 N 2300-1 (ред. от 02.07.2013) "О защите прав потребителей”	Информирует, какая информация о БАД и каким образом должна предоставляться потребителю.
“О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения” от 30.03.1999 г. №52-ФЗ (редакция 2013)	Санитарно-эпидемиологические требования к пищевым продуктам, пищевым добавкам, продовольственному сырью, а также контактирующим с ними материалам и изделиям и технологиям их производства Регламентирует уровень безопасности пищевых продуктов (в том числе БАД) при производстве внутри страны и при ввозе в РФ. Предусматривает строгую уголовную, административную и дисциплинарную ответственность

	за несоблюдение санитарного законодательства.
<p>Постановления Главного государственного санитарного врача РФ от 17 апреля 2003 г. N50 "О введении в действие санитарно-эпидемиологических правил и нормативов СанПиН 2.3.2.1290-03 м)</p> <p>Сан ПиН 2.3.2. 1290-03</p> <p>Гигиенические требования к организации производства и оборота биологически активных добавок.</p>	<p>Гигиенические требования к организации производства и оборота биологически активных добавок к пище Требования к этикетке БАД</p> <p>4.4. Информация о БАД должна содержать:</p> <ul style="list-style-type: none"> - наименования БАД, и в частности: - товарный знак изготовителя (при наличии); <p>обозначения нормативной или технической документации, обязательным требованиям которых должны соответствовать БАД (для БАД отечественного производства и стран СНГ);</p> <ul style="list-style-type: none"> - состав БАД с указанием ингредиентного состава в порядке, соответствующем их убыванию в весовом или процентном выражении; - сведения об основных потребительских свойствах БАД;

- сведения о весе или объеме БАД в единице потребительской упаковки и весе или объеме единицы продукта;
- сведения о противопоказаниях для применения при отдельных видах заболеваний;
- указание, что БАД не является лекарством;
- дата изготовления, гарантийный срок годности или дата конечного срока реализации продукции;
- условия хранения;
- информация о государственной регистрации БАД с указанием номера и даты;
- место нахождения, наименование изготовителя (продавца) и место нахождения и телефон организации, уполномоченной изготовителем (продавцом) на принятие претензий от потребителей.

4.5. Информация, предусмотренная настоящей статьей, доводится до сведения потребителей в любой доступной для прочтения потребителем форме.

4.6. Использование термина

	<p>"экологически чистый продукт" в названии и при нанесении информации на этикетку БАД, а также использование иных терминов, не имеющих законодательного и научного обоснования, не допускается.</p>
<p>Методические рекомендации МР 2.3.1.1915-04 "Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ" от 2 июля 2004 г.,</p>	<p>определяющие традиционные пищевые продукты и продовольственное сырье животного и растительного происхождения, альтернативные источники идентичных традиционным источникам пищевых и биологически активных веществ, адекватные и верхние допустимые уровни их суточного потребления для взрослых в составе продуктов диетического питания и БАД к пище при энергетической ценности 2300 ккал.</p>
<p>письмо Роспотребнадзора от 07.06.06 N0100/6272-06-32.</p>	<p>Нанесение на упаковку БАД сведений, не содержащихся в регистрационном удостоверении, в том числе об их эффективности, возможно только после проведения добровольной сертификации БАД и наличия сертификата соответствия.</p>

	Продукция, прошедшая сертификацию, маркируется знаком соответствия Системы
Постановление Правительства РФ от 1 декабря 2009 г. N 982 «Об утверждении единого перечня продукции, подлежащей обязательной сертификации, и единого перечня продукции, подтверждение соответствия которой осуществляется в форме принятия декларации о соответствии»	ПОДТВЕРЖДЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ БАДОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ В ФОРМЕ ПРИНЯТИЯ ДЕКЛАРАЦИИ О СООТВЕТСТВИИ
Постановление Правительства РФ от 19.01.1998 N 55 (ред. от 04.10.2012) "Об утверждении Правил продажи отдельных видов товаров...»	внесены изменения, в соответствии с которыми разносная торговля БАД, как пищевыми продуктами, является недопустимой.
Федеральный реестр биологически активных добавок к пище	Содержит перечень всех БАД с показаниями к применению
Решение Комиссии Таможенного союза от 28.05.2010 N 299 (ред. от 15.01.2013) "О применении санитарных мер в таможенном союзе"	Все систематизировано: Терминология, гигиенические требования, дозирование

Цель работы. Определить содержания коэнзима Q10 в биологически активных добавках методами спектрофотометрии и вольтамперометрии и сопоставить его с нормативными документами.

Исходя из цели, сформировали задачи:

1. Исследовать влияние рН фонового электролита на электрохимический сигнал коэнзима Q10;
2. Установить некоторые метрологические характеристики вольтамперометрической и спектрофотометрической методик определения коэнзима Q10;
3. Исследовать влияние сопутствующих веществ БАД на аналитический сигнал коэнзима Q10 методом «введено-найдено»;
4. Определить содержание коэнзима Q10 в БАДах спектрофотометрическим и вольтамперометрическим методами.

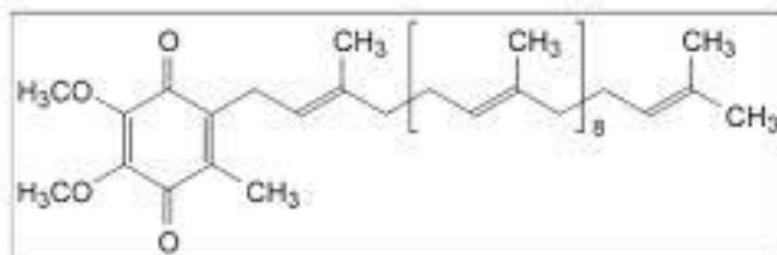
История происхождения коэнзима Q10.

В 1955 году доктор Фредерик Крэйн (штат Висконсина, США) выделил коэнзим Q10 из митохондрии бычьего сердца.

В 1957 году профессор Мортон (Англия) выделил коэнзим Q10 из клеток печени крысы и ввел для него имя «убихинон», то есть «вездесущий хинон».

В 1958 году профессор Карл Фолкерс и сотрудники Merck, Inc. определили Точную химическую структуру CoQ10 – производного 2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинона (рис. 1).

Ubidecarenonum



$C_{55}H_{90}O_4$

M_r 863

DEFINITION

2-[(all-*E*)-3,7,11,15,19,23,27,31,35,39-Decamethyltetraconta-2,6,10,14,18,22,26,30,34,38-decaenyl]-5,6-dimethoxy-3-methylbenzene-1,4-dione.

Рис. 1. Структурная формула CoQ10 в соответствии Eur.Ph. 2005 version 5.2

Профессор Ямэмура (Япония) в середине 1960-ых годов стал первым в мире, кто использовал кофермент Q7 в лечении застойной сердечной недостаточности. Mellors и Tappel показали, что CoQ6 является эффективным антиоксидантом [4],[5].

1. Физико-химические свойства коэнзима Q₁₀

Коэнзим Q10 относится к группе коферментов – убихинонов или бензохинонов, содержащих хиноидную группу (отсюда обозначение Q) и несколько изопрениловых групп [3]. В митохондриях клеток большинства млекопитающих, включая человека, доминирует убихинон с 10 изопреновыми звеньями (рис. 2).

Низшие гомологи (например, Q1-Q5) представляют собой маслянистые жидкости. Высшие гомологи представляют собой желто-оранжевые или ярко-оранжевые кристаллы без вкуса и запаха

Убихинон открыт во всех живых эукариотических клетках грибов, растений, микроорганизмов, животных, отсюда название «убихинон» - «вездесущий хинон».

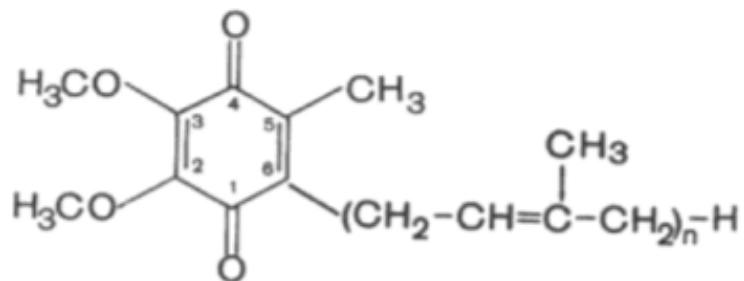


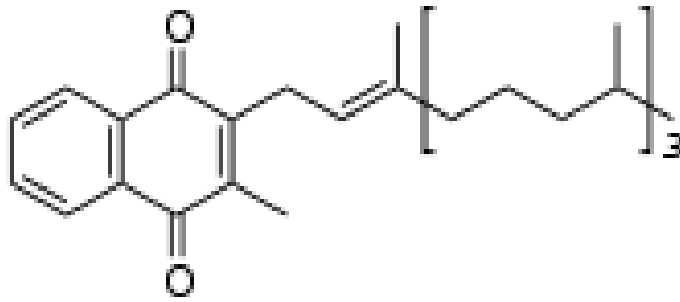
Рис. 2 - химическое строение коэнзима Q10

Кофермент Q представляет собой желто-оранжевые кристаллы без вкуса и запаха. Температура плавления 49-51° С. Растворим в диэтиловом эфире, очень слабо растворим в этаноле, практически нерастворим в воде. На свету постепенно разлагается с изменением цвета. С водой образует эмульсию с концентрацией 10 %, 20 % и 40 %

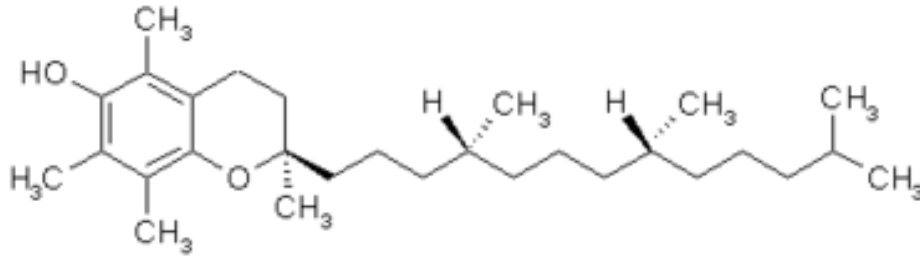
По химической природе кофермент Q имеет сходство в строении молекулы с витаминами E и K и представляет собой 2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинон с изопреновой цепью в 6-м положении. В зависимости от количества звеньев в боковой изопреновой цепи коэнзимы могут обозначаться по-разному. По своему строению молекула коэнзима Q10 схожа с витамином K и витамином E (рис. 2).

В наибольших количествах коэнзим Q₁₀ находится в сердце, печени и почках, то есть в наиболее активно работающих органах. Коэнзим Q₁₀ в основном находится во внутренней мембране митохондрий.

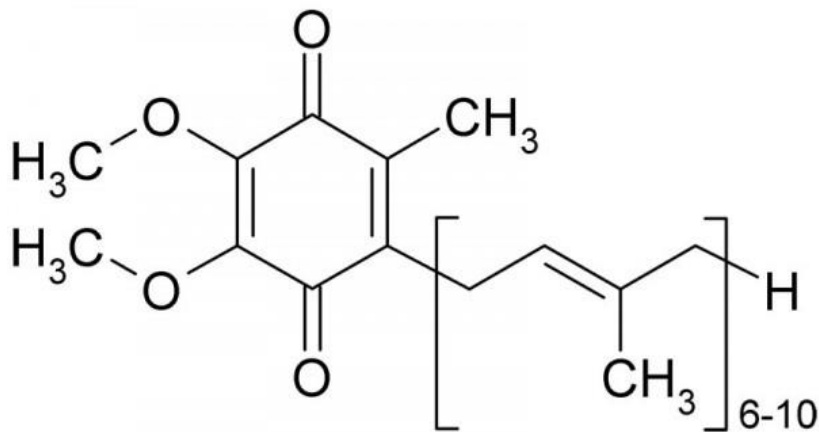
Специфический спектр поглощения в ультрафиолетовой области с характерным максимумом при 275 нм имеет убидекаренон.



1



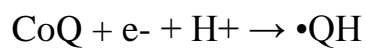
2



3

Рис. 3 – строение молекул (1)-витамин К, (2)-витамин α -токоферол, (3)-
CoQ10

Кофермент Q в организме существует в восстановленной (убихинол, CoQH₂)
и окисленной (убихинон, CoQ10) формах (рис. 3)



где $\bullet\text{QH}$ – убисемихиноновый радикал.

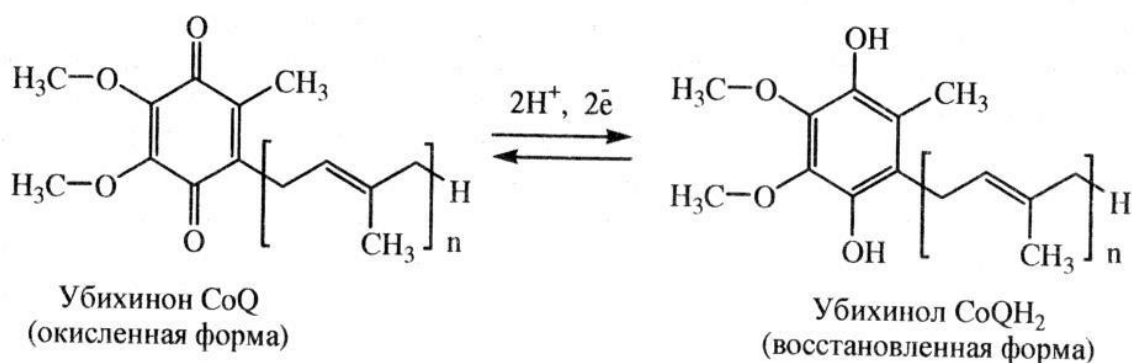


Рис. 4 – окисленная и восстановленная форма убихинона

Именно в восстановленной форме CoQ10 выступает в качестве антиоксиданта, предотвращающего повреждение ДНК, липидов, белков и других молекул [10].

2. Биологическая роль в организме

В 1978 году Питеру Митчеллу была присуждена Нобелевская премия, за вклад в расшифровку биологических процессов превращения энергии, в том числе коэнзима Q10 как энергетического транспортера.

В 1975 году Питер Митчелл предложил описание механизма, названного «петля Митчелла». Коэнзим Q10 - составная часть мембран митохондрий и обязательный компонент терминальной дыхательной электронно-транспортной цепи митохондрий.

Коэнзим Q10 необходим и незаменим для кислородно-зависимого образования энергии. Если коэнзим Q10 отсутствует, то процесс прерывается.

Кофермент Q является антиоксидантом и регенерируется организмом, в отличие от других антиоксидантов. А также, кофермент Q восстанавливает антиоксидантную активность витамина E — α -токоферола.

2.1 переносчик электронов

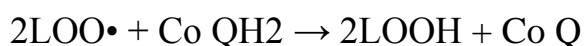
Коэнзим Q10 – участвующее в энергетическом обмене соединение, является наиболее важным кофактором энзимных реакций энергетического обмена (синтез АТФ, перенос электронов).

Коэнзим Q10 в митохондриях участвует в синтезе АТФ как переносчик электронов, сопрягающий процессы окислительного фосфорилирования и электронного транспорта. Коэнзим Q10 необходимое звено для передачи электронов с I и II комплекса на III комплекс дыхательной цепи. Его недостаток заключается в затруднении в передаче электронов по дыхательной цепи, комплексы I и III становятся основными генераторами супероксид-радикалов [6-8].

Процесс переноса электронов и протонов хиноновым кольцом имеет фундаментальное значение для всех форм жизни: убихинон в митохондриях животных, пластохинон в хлоропластах растений, менахинон в бактериях [9].

2.2 антиоксидантная функция

Антиоксиданты – ферментные и неферментные агенты, предотвращающие или ликвидирующие активные формы кислорода. Коэнзим Q10 уникален как антиоксидант. У млекопитающих в митохондриях из поступающего в организм кислорода потребляется 80%, которые расходуются на синтез АТФ. Митохондриальный CoQ10 после окисления эффективно регенерируется дыхательной цепью и обычно находится в восстановленной форме (CoQH₂). Активность восстановленной формы кофермента Q на три порядка выше невосстановленной. Реакцию нейтрализации свободных радикалов восстановленным коферментом Q можно записать следующим образом:



Исследования механизма действия CoQ10 дали возможность предполагать, что CoQ10H₂ воздействует на начальный процесс и

предотвращает формирование пероксильных радикалов, а витамин Е блокирует их. CoQ10 как антиоксидант более эффективен, чем витамин Е.

Коэнзим Q10 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.

Но с возрастом содержание коэнзима Q10 в организме уменьшается, и это приводит к уменьшению способности организма противостоять действию свободных радикалов, это приводит к потребности приема БАДов, содержащих коэнзим Q10.

3. методы определения коэнзима Q10 (англ. Часть)

Methods for determination of coenzyme Q10

В настоящее время существуют три метода определения коэнзима Q10, а именно хроматографический, электрохимический и спектрофотометрический методы.

3.1 Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

High performance liquid chromatography (HPLC)

3.2 Электрохимический метод

3.3 Спектрофотометрический метод

5.Способы пробоподготовки биологических объектов

Самой важной и необходимой процедурой является подготовка пробы. Эта процедура предшествует количественному анализу и имеет целью отделение определяемого вещества от сопутствующих мешающих компонентов матрицы. Определение коэнзимов Q является технически

сложным. Коэнзим Q10 проявляет гидрофобность из-за его полипренилфосфатной боковой цепи, благодаря этому CoQ10 легко растворим в липидах и неполярных растворителях, но труднорастворим в воде и полярных растворителях. Наличие бензохинонного кольца обеспечивает его легкое окисление.

Обеспечивает правильность и воспроизводимость методики, существенно влияя и на чувствительность определения, полнота перехода определяемых веществ из образца в пробу. На этой стадии возможно разведение или концентрация пробы.

Сложной аналитической задачей количественное определение коэнзима Q10 делают свойства, как его расположение во внутренней мембране митохондрий обеспечивает интенсивную изоляцию от воздействия биологических систем; коэнзим Q10 чувствителен к физико-химическим изменениям.

Аналитические методы включают в себя: осаждение белков, выделение соединения, очистку полученного экстракта с одновременной защитой от химических превращений.

Существует несколько основных подходов к выделению коэнзимов из биологических образцов: первичная, осаждение белков и гидролиз, процесс экстракции, восстановление экстрагированных форм.

5.1 Первичная

В этап подготовки образца входит тщательная гомогенизация, а затем определение коэнзима Q10 в твердой пище, ткани. Чтобы не затруднялся анализ CoQ10 в биологических материалах из-за его нестабильности, нужно снижать температуру пробоподготовки образцов. Благодаря этому, скорость разложения CoQ10 снизится. Для измельчения образцов ткани не требуется больше 4-5°C. Мы знаем, что CoQ10 подвергается окислению и для того

чтобы защитить образцы во время пробоподготовки от нежелательного воздействия кислорода добавляем в раствор антиоксиданты, боргидрид натрия или 2,6-дитрет-бутил-4-метилфенол.

5.2 Осаждение белков

В этап подготовки осаждения белков входит депротеинизация гомогенатов (удаление) или биологических жидкостей, например, кровь, плазма.

Основным методом для количественного определения CoQ10 является жидкостная хроматография. Но на хроматографическую колонку плохо влияют белки, которые находятся в образцах и это может привести к подавлению сигнала на хроматограмме. Для осаждения белков используются метанол, этанол, 1-пропанол, 2-пропанол или их смесь.

Так как этанол является малотоксичным и доступным его чаще используют агентом осаждения белка в крови человека и из гомогената тканей [11]. Для удаления мешающих веществ, сопутствующих коэнзим Q10, используют щелочное омыление. Но также омыление является основным источником аналитической ошибки, поэтому этот процесс лучше избегать. Если же важно использовать этот процесс, то нужно помнить, что щелочной гидролиз разрушает CoQ10. Используют спиртовые растворы КОН и NaOH, чтобы устранить разрушение CoQ10.

5.3 Экстракция

Основное условие процесса экстракции – выделяемый компонент должен быть свободным от всех компонентов, которые могут быть элюированы в то же время, что и аналит. Или они могут прерывать хроматографический анализ.

После этапа депротеинизации, следует этап изоляции коэнзима Q10 от веществ, мешающих анализу. Это возможно с помощью жидкостно-жидкостной экстракции. Часто используют для экстракции коэнзима Q10 n-гексан или смесь этанол:метанол. Для извлечения коэнзима Q10 из пищевых

добавок [12], пищевых проб [13], плазмы крови человека [14]. Смесь петролейный эфир:этилацетат:метанол (1:1:1) применяли для выделения коэнзима Q10 из мультивитаминных БАД [15]. Смесь этанол:гексан (1:5) применяли для выделения коэнзима Q10 из проб образцов пищевой промышленности. 2-пропанол использовали в качестве экстрагента для выделения коэнзима Q10 из образцов продукта питания [16]. N-пропанол рекомендуется организацией «International CoQ10 Association», как депротеинезиатор и экстракционный агент для выделения CoQ10 из плазмы крови [17].

Для выделения и очистки коэнзима Q10 применяется твердофазовая экстракция (ТФЭ). Альтернативой классической жидкостно-жидкостной экстракции взяли процедуру ТФЭ-СО₂. Методику процесса ТФЭ-СО₂ разработали для выделения коэнзима Q10 из сухой биомассы *Pseudomonas diminuta* [18]. Выделение коэнзима Q10 составляла 96,2%.

5.4 Восстановление экстрагированных форм

Удаление растворителя, который использовали при экстракции, является последним этапом процесса пробоподготовки. Удаление остатков растворителя добивались пропусканием слабого тока инертного газа через экстракт, далее растворяли сухой остаток в небольшом объеме растворителя, который подходил. При высушивании воспользовались распространенным методом под воздействием азота. В случае большого количества экстракта применяли выпаривание под воздействием низких давлений [13]. Этап процесса высушивания проходит долго, а если количество образца большое, то процесс становится наиболее долгим. Обзор всех недостатков данного процесса приводит к тому, что исключение процедуры восстановления экстрагированных форм кажется наиболее благоприятной [17].

Экспериментальная часть

1. Аппаратура, реактивы, электроды, ячейки, объекты исследования

Аппаратура

Все вольтамперометрические исследования проводились на вольтамперометрическом анализаторе ТА-2, с подключенным к нему персональным компьютером. Анализатор ТА-2 запатентован и включен в ГОСРЕЕСТР средств измерений РФ под №15279-99, Республики Беларусь и Республики Казахстан. Анализатор реализует метод инверсионной вольтамперометрии, на который выпущен ГОСТ Р 51301-99, ГОСТ Р 51962-2002. Особенности анализатора является низкая себестоимость анализа, Одновременный анализ трех разных проб, высокоэффективное перемешивание за счет вибрации электродов, компьютерное управление проведением анализа и обработкой результатов измерений, высокая производительность и простота обслуживания, УФ-облучение для устранения мешающего влияния растворенных органических веществ и кислорода в анализируемой пробе, одновременное определение Zn, Cd, Pb, Cu.

Анализатор ТА-2 служит для автоматизированного анализа методом вольтамперометрии проб лекарственных препаратов, косметики, минералов, биологических объектов и др. Прибор может работать в двух режимах: простом и дифференциальном. Также анализатор ТА-2 имеет 4 вида разверток поляризующего напряжения: ступенчатую, дифференциально-импульсную, постоянно-токовую, квадратно-волновую. Для удаления кислорода в растворе через этот же раствор пропускают азот газообразный через шланг со съемной трубкой с узким наконечником, который присоединен к баллону. Подготовка к работе и проведение работы производили в соответствии с эксплуатацией прибора.

Спектрофотометрическое определение коэнзима проводили на спектрофотометре Agilent Technology Cary 60 UV-Vis, с подключенным к нему персональным компьютером. Спектрофотометр Agilent Cary 60 UV-Vis

это экономичное решение для любой лаборатории. Лампа в таком спектрофотометре может работать до десяти лет, а также благодаря прочной и надежной конструкции, высокому качеству сборки спектрофотометр для ультрафиолетовой и видимой области будет служить долго. У спектрофотометра диапазон длин волн 190-1100 нм, фиксированная полоса длин волн 1,5 нм, скорость развертки спектра 24000 нм/мин, частота выборки данных до 80 раз/сек, кварцевая просветленная оптика, перестройка длины волны при приостановке измерений, нечувствительность к внешней засветке. Подготовка к работе и проведение работы производили в соответствии с эксплуатацией прибора.

Для получения дистиллированной воды использовали «Аквадистиллятор ДЭ-4». Использовали лабораторные аналитические весы А&D HL-400 «Госметр» (Россия) для получения точного результата в навеске. Аналитические весы, с погрешностью взвешивания не более 0,0002 г. Стаканчики из кварцевого стекла объемом 10 см³ использовали в качестве электрохимической ячейки. Ячейки устанавливаются в анализатор, на платформу в специализированное отверстие. Использовали лабораторную мерную посуду: цилиндры стеклянные вместимостью 10см³, наливные конические колбы из стекла вместимостью 25, 50, 100, 1000 см³. Чистоту посуды проверяли методом вольтамперометрии, а именно начинали делать пробный опыт в фоновом электролите. Если на анодно-катодных вольтамперограммах отсутствуют пики, то фоновый электролит и используемая посуда считались чистыми. Если же пики присутствовали, то отмывали посуду концентрированной азотной кислотой, а затем кипятили в течение 10-15 мин на плите с закрытой спиралью.

Электроды и ячейки

Для экспериментальной работы использовали электрохимическую ячейку, в виде стаканчика из кварцевого стекла объемом 10 см³, который

устанавливается на платформу анализатора в специализированное отверстие. В этот стаканчик погружаются рабочий (индикаторный) электрод, электрод сравнения и вспомогательный электрод.

В качестве рабочего (индикаторного) электрода использовали стеклоуглеродный электрод (СУЭ). Электрод выглядит в виде стеклянной трубочки, в которую впаяна пластинка стеклографита, диаметром 2 мм, с медным контактным проводником. У электрода площадь рабочей поверхности составляет 0,075 см². Стеклоуглеродный электрод хранится в спиртовом растворе. Перед работой подготовили поверхность электрода, шлифовали ее на фильтре и выдерживали 2-5 мин в этиловом спирте, чтобы удалить присутствующие поверхностно-активные органические вещества (ПАОВ).

В качестве электрода сравнения использовали хлоридсеребряный электрод (ХСЭ). Электрод выглядит в виде полого цилиндра, заполненный насыщенным (3М KCl) раствором хлорида калия, в который опущена серебряная проволока, покрытая труднорастворимой солью хлорида серебра.

В качестве вспомогательного электрода использовали платиновый электрод (Pt Э). представляет собой платиновую пластинку, омываемую газообразным водородом, погруженную в раствор, содержащий ионы водорода.

Объекты исследования

1. Кудесан раствор (Эвалар, Россия)
2. Кудесан форте раствор (Аквион, Россия)
3. Тайм эксперт (Эвалар, Россия)

В этих препаратах основным активным веществом является коэнзим Q₁₀, а также токоферол ацетат. Содержание активных и вспомогательных веществ, их качественный и количественный состав в исследуемых БАД, представлен в таблице 2.

Таблица 2. Активные и вспомогательные вещества БАД.

	Кудесан раствор (Эвалар, Россия)	Кудесан форте раствор (Аквион, Россия)	Тайм эксперт (Эвалар, Россия)
Активные вещества	Убихинон (коэнзим Q10) 30 мг/мл, витамин E 4,5 мг/мл	Убихинон (коэнзим Q10) 60 мг/мл, витамин E 6,8 мг/мл (альфа- токоферола ацетат 50%)	Коэнзим Q10 30 мг/мл, витамин E 10 мг/мл
Вспомогате льные вещества	Макроголаглицерилгидро ксистеарат, натрия бензоат, аскорбил пальмитат, лимонная кислота, очищенная вода.	Аэросил, примелоза, колидон (поливинил пирролидон) E1201, кальций стеариново кислый E470, тальк фармацевтическ ий E553, целлюлоза микрористалл ическая E460.	Целлюлоза микрористалли ческая, тальк фармацевтическ ий, кальция карбонат, стеарат, аэросил.

Раствор стандартного коэнзима Q10 готовили для вольтамперометрического метода определения. Навеску, взвешенную на аналитических весах с погрешностью 0,0002 г, растворили в этиловом спирте, а затем нагревали до температуры, не превышающей 35°С. Раствор коэнзима Q10 готовили перед началом каждого эксперимента.

Экстракция

Для исследования содержания коэнзима Q10 в БАД-ах необходимую навеску (или объем) исследуемого БАД переносят в мерную колбу на 50 см³, добавляют 50 см³ 96% этилового спирта, нагревают до температуры, не превышающей 35°С. Далее раствор центрифугируют 15 мин при скорости 4500 об/мин, а затем полученный экстракт анализировался вольтамперометрическим методом.

Спектрофотометрический метод

Раствор стандартного коэнзима Q10 готовили для спектрофотометрического метода определения. Навеску, взвешенную на аналитических весах с погрешностью 0,0002 г, растворили в гексане. Раствор коэнзима Q10 готовили перед началом каждого эксперимента.

Экстракция

Необходимую навеску (или объем) исследуемого БАД переносят в мерную колбу на 50 см³. Добавляют 25 см³ гексана и доводят объем до метки дистиллированной водой, для удаления водорастворимых компонентов, сопутствующих исследуемому образцу. Далее раствор оставляют в темном месте на 1 час. После этого содержимое колбы переносят в делительную воронку, перемешивают, отстаивают и отделяют органический слой от воды.

Отделившийся органический слой отфильтровывается через фильтровальную бумагу два раза. Полученный органический слой был исследован спектрофотометрическим методом.

2. Определение коэнзима Q10 вольтамперометрическим методом

В электрохимическую ячейку, стаканчики из кварцевого стекла, объемом 10см^3 , помещаем раствор фонового электролита, в качестве которого использовался фосфатный буферный раствор с $\text{pH}=6,86$. Трехэлектродная ячейка состоит из электродов: рабочий стеклоуглеродный электрод (СУЭ), сравнения - хлоридсеребряный электрод (ХСЭ), вспомогательного – платиновый электрод (PtЭ), которые помещали в раствор фонового электролита, а затем подключали к вольтамперометрическому анализатору ТА-2 в комплекте с персональным компьютером. Использовали постоянно-токовый режим анодной вольтамперометрии, скорость развертки потенциала $W = 80 \text{ мВ/сек}$, рабочий диапазон потенциалов от $-1,5$ до $1,5$ (от 0 до $-1,5$) В, время накопления вещества на электроде 30 сек. , потенциал накопления $-1,5$ В, время успокоения 30 сек. Затем проводили съемку вольтамперограмм фонового электролита не менее 3 раз. После того, как убедились в отсутствии загрязнений в фоновом растворе и воспроизводимой фоновой кривой приступали к работе с исследуемым веществом.

Количественно дозатором вносили определенный объем исследуемого раствора и затем проводили съемку вольтамперограмм в соответствии с последовательностью описанной выше. Для удаления мешающего влияния кислорода перед каждой новой добавкой через исследуемый раствор в течение 10 минут пропускали азот под давлением из баллона.

1 Аналитический сигнал

Коэнзим Q_{10} принимает три окислительно-восстановительных формы, т.к. является бензохиноном. Первой окислительно-восстановительной формой

является убихинон CoQ – полностью окисленный, второй является убихинол CoQH_2 – полностью восстановленный, и третьей - убисемихинон CoQH^* - полу восстановленный или окисленный радикал. В организме биохимические функции выполняются восстановленной формой коэнзима Q_{10} .

В данной работе было изучено влияние pH раствора и веществ, сопутствующих исследуемому веществу исследовали для оптимальных условий получения аналитического сигнала коэнзима Q_{10} .

1.1 Влияние pH раствора на аналитический сигнал

В водных средах процесс окисления-восстановления коэнзима Q_{10} протекает при участии двух протонов и двух электронов, поэтому следующим этапом работы стало изучение влияния pH фонового раствора на электрохимический сигнал коэнзима Q_{10} .

Определили оптимальный фоновый электролит для определения аналитического сигнала коэнзима Q_{10} на СУЭ. Для этого мы готовили фоновые буферные растворы с pH = 1,65; 4,01; 6,86; 9,18. Исследование проводили в условиях постоянно токовой вольтамперометрии, а в качестве рабочего (индикаторного) электрода использовали СУЭ.

Влияние pH фонового электролита на электрохимический сигнал коэнзима Q_{10} приведено на рисунке 5 и 6.

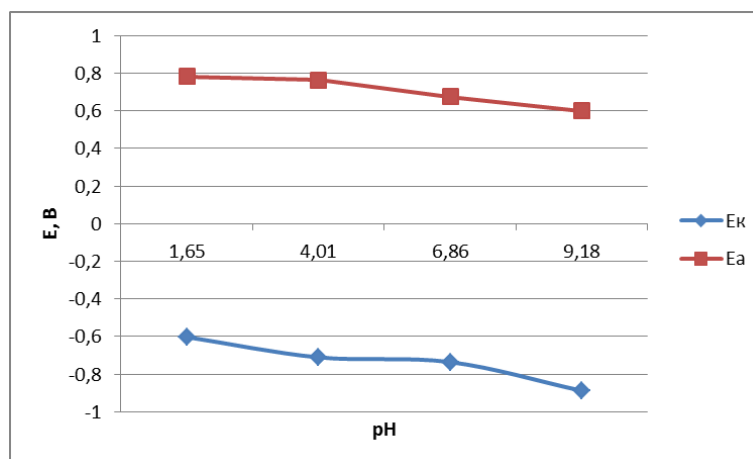


Рис. 5 - Зависимость потенциала от pH

Как видно из рисунка 5 при изменении pH среды происходит сдвиг окислительно-восстановительных потенциалов в соответствии с уравнением Нернста.

Уравнение Нэрнста:

$$E_{\psi_2} = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln a_{H^+}^y = E^0 - \frac{vRT}{zF} \text{pH}$$

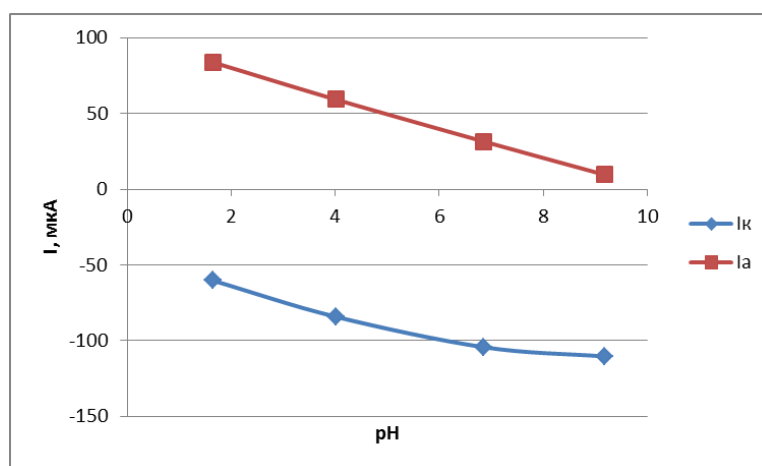


Рис. 6 – зависимость тока от pH

Из рисунка 6 видно, что при увеличении кислотности среды анодный ток окисления увеличивается, а катодный ток восстановления уменьшается. Предполагается, что в кислой среде происходит протонизация молекулы коэнзима Q₁₀, что облегчает его окисление. В щелочной среде наблюдается увеличение тока восстановления коэнзима Q₁₀ вследствие полной диссоциации гидроксильной группы (-ОН) гидрохинонной части молекулы коэнзима Q₁₀, и как следствие облегчение процесса восстановления.

В качестве аналитического сигнала был выбран сигнал электроокисления коэнзима Q₁₀ в водных средах при pH=6,86. Это обусловлено стабильностью молекулы коэнзима Q₁₀ в нейтральных средах.

1.2 Влияние веществ на аналитический сигнал

Препараты, основанные на коэнзиме Q_{10} , состоят еще и из различных веществ, которые также влияют на аналитический сигнал коэнзима Q_{10} .

Мы выявили различные соединения, которые являются электрохимически активными и исследовали их влияние на аналитический сигнал коэнзима Q_{10} , таким образом, брали концентрацию данных веществ равной концентрации этих веществ, в препаратах.

1.2.1 влияние аскорбиновой кислоты на аналитический сигнал коэнзима Q_{10}

Аскорбиновая кислота (витамин С) – органическое соединение, является одним из основных веществ в человеческом рационе. Выполняет биологические функции восстановителя, восстанавливает убихинон и витамин Е. Является мощным антиоксидантом, нормализует окислительно-восстановительные процессы.

Аскорбиновая кислота также является одним из основных компонентов БАД и других препаратов, которые содержат коэнзим Q_{10} .

Исследования влияния витамина С на аналитический сигнал коэнзима Q_{10} (электроокисление) проводили в постоянно токовой вольтамперометрии.

Область потенциалов от -1,5 до 1,5 В, скорость развертки потенциала 80 мВ/сек. В качестве рабочего электрода использовали СУЭ, вспомогательного – РтЭ, сравнения – ХСЭ. В качестве фонового электролита использовали фосфатный буферный раствор с $pH=6,86$.

Раствор аскорбиновой кислоты с массой 0,006 г, готовили следующим образом, брали навеску аскорбиновой кислоты, взвешивали на аналитических весах с погрешностью не более 0,0002 г, затем переносили в мерную колбу и доводили до метки этиловым спиртом.

В результате нашего исследования мы увидели влияние аскорбиновой кислоты на аналитический сигнал коэнзима Q_{10} . После введения в раствор аскорбиновой кислоты объемом 300 мл, аналитический сигнал коэнзима Q_{10}

резко возрастает. Мы знаем, что коэнзим Q_{10} в растворе может присутствовать в двух формах, окисленной - CoQ_{10} и восстановленной - $CoQ_{10}H_2$. Так как, восстановленная форма коэнзима Q_{10} неустойчива и переходит в окисленную форму, под воздействием внешних факторов (свет, кислород). Т.к. аскорбиновая кислота является сильным восстановителем и отдает 2 иона водорода и, таким образом, восстанавливает CoQ_{10} .

Исходя из этого, делаем вывод о том, что при добавке аскорбиновой кислоты в раствор увеличивается сигнал электроокисления коэнзима Q_{10} . Это говорит о том, что при добавке исследуемого вещества в раствор коэнзима Q_{10} , то происходит восстановление CoQ_{10} , а так же в сторону убихинола смещается отношение убихинон:убихинол.

1.2.2 влияние витамина B_6 на аналитический сигнал коэнзима Q_{10}

Витамин B_6 является на самом деле не одним химическим соединением, а целой группой веществ, пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин это провитамины, из которых образуется активная форма B_6 – пиридоксальфосфат это вещество как раз и является витамином. Легко растворяется в воде и спирте, значительно хуже или вовсе не растворяется в других растворителях. Пиридоксин быстро разрушается под воздействием света, однако устойчив к действию кислорода и высоких температур.

Количественное определение водорастворимых витаминов B_6 проводят методом совместной ВА - определение группы водорастворимых витаминов основано на их способности электроокисления на СУЭ при определенных потенциалах относительно ХСЭ на фоне 0,1 моль/дм $3C_4H_5O_6Na \cdot H_2O$ [19]. Главная функция пиридоксиновых коферментов – перенос аминогрупп и карбоксильных групп в реакциях метаболизма аминокислот.

Исследования влияния витамина B_6 на аналитический сигнал коэнзима Q_{10} проводили в постоянно токовой вольтамперометрии. В качестве фонового электролита использовали фосфатный буферный раствор с $pH=6,86$. В

качестве рабочего электрода использовали СУЭ, сравнения – ХСЭ, вспомогательного – PtЭ. В ходе эксперимента выявили, что витамина В₆ влияет на аналитический сигнал коэнзима Q₁₀.

Раствор витамина В₆ готовили следующим образом, брали навеску витамина В₆, взвешивали на аналитических весах с погрешностью не более 0,0002 г, затем переносили в мерную колбу и доводили до метки этиловым спиртом.

В результате нашего исследования мы увидели влияние витамина В₆ на аналитический сигнал коэнзима Q₁₀. После введения в раствор витамина В₆ объемом 300 мл, аналитический сигнал коэнзима Q₁₀ возрастает.

Сигнал электроокисления CoQ₁₀ возрастает при добавлении витамина В₆, т.к. сам витамин окисляется, а коэнзим Q₁₀ восстанавливает.

Исследование свидетельствует о том, что витамин В₆ и аскорбиновая кислота способны восстанавливать убихинон до убихинола в растворе, при том, что сами они при данных условиях съемки электроактивными не являются. В таблице 3 приведены результаты веществ, которые влияют на аналитический сигнал коэнзима Q₁₀.

Таблица 3. Влияние сопутствующих веществ БАД на аналитический сигнал коэнзима Q₁₀ (P = 0,95; n = 3).

Название	Название вещества	Соотношение CoQ ₁₀ к меш. в-ву	Введено CoQ ₁₀ , См, мМ	Найдено CoQ ₁₀ , См, мМ
Кудесан раствор (Эвалар, Россия)	Витамин Е	1:2	0,1	0,10 ± 0,02
	ДГК	5:1	0,1	0,93 ± 0,03
	Аскорбиновая кислота	3:1	0,1	0,14 ± 0,03
Кудесан форте	Витамин Е	1:2	0,1	0,10 ± 0,02
	Натрия	10:1	0,1	0,11 ± 0,02

раствор (Аквион, Россия)	бензоат			
	Аскорбиновая кислота	3:1	0,1	$0,14 \pm 0,02$
Тайм эксперт (Эвалар, Россия)	Витамин Е	1:2	0,1	$0,10 \pm 0,02$
	Витамин В ₆	5:1	0,1	$0,13 \pm 0,03$
	Витамин В ₁₂	5:1	0,1	$0,96 \pm 0,02$

У антиоксидантов механизм действия таков, когда они окисляются сами, то тогда они предохраняют от окисления другие вещества. Но из нашего эксперимента, мы можем увидеть, что вещества, аскорбиновая кислота (витамин С) и пиридоксин (витамин В₆), не позволяют коэнзиму Q₁₀ процесс окисления, но увеличивают при этом его содержание восстановленной формы. Перед тем как определяем при аналитическом сигнале содержание коэнзима Q₁₀, мы избавляемся от влияния витамина С и витамина В₆ на стадии пробоподготовки. Если вещества не растворяются в этаноле, то с помощью центрифугирования эти вещества выпадают в осадок, а мы используем над осадочную жидкость. Также мы исследовали влияние других веществ на аналитический сигнал коэнзима Q₁₀, этими веществами были витамин В₁₂, витамин Е, дигидрокверцетин (ДГК), натрий бензоат, но они не оказали влияния на аналитический сигнал коэнзима Q₁₀.

Правильность методики количественного анализа определения коэнзима Q₁₀ в модельных растворах проверяли методом «введено-найдено» в табл. 4.

Таблица 4. Результаты количественного определения коэнзима Q₁₀ в реальных объектах методом введено-найдено (P = 0,95, n = 3)

Введено, C _м · 10 ⁵ , М	Найдено, C _м · 10 ⁵ , М	ε, %
5	$5,6 \pm 0,3$	12

20	$21,3 \pm 0,7$	6,5
40	$38,6 \pm 2,2$	3,5
60	$63,1 \pm 3,7$	5,2
80	$76,4 \pm 6,1$	4,5
100	$105,7 \pm 8,9$	5,7

Исходя из данных, приведенных в табл.4, делаем вывод о том, что предложенный нами метод удовлетворителен для данной работы.

3. Определение коэнзима Q₁₀ спектрофотометрическим методом

Определение коэнзима Q₁₀ основано на его способности генерировать спектр поглощения при длине волны 275 нм. При условиях: время интеграции 1 сек., спектральная пропускная способность канала 2 нм, шаг сканирования 0,1 сек. Спектрофотометрическое определение коэнзима Q₁₀ проводили на спектрофотометре Agilent Technology Cary 60 UV-Vis.

При спектрофотометрическом определении навеску стандартного вещества коэнзима Q₁₀, взвешенную с погрешностью не более 0,0002 г., растворяли в гексане.

Затем построили колебровочную зависимость оптической плотности коэнзима Q₁₀ от его концентрации в кювете. Зависимость линейна в диапазоне концентраций от $1 \cdot 10^{-6}$ до $5 \cdot 10^{-5}$ М (рис.7).

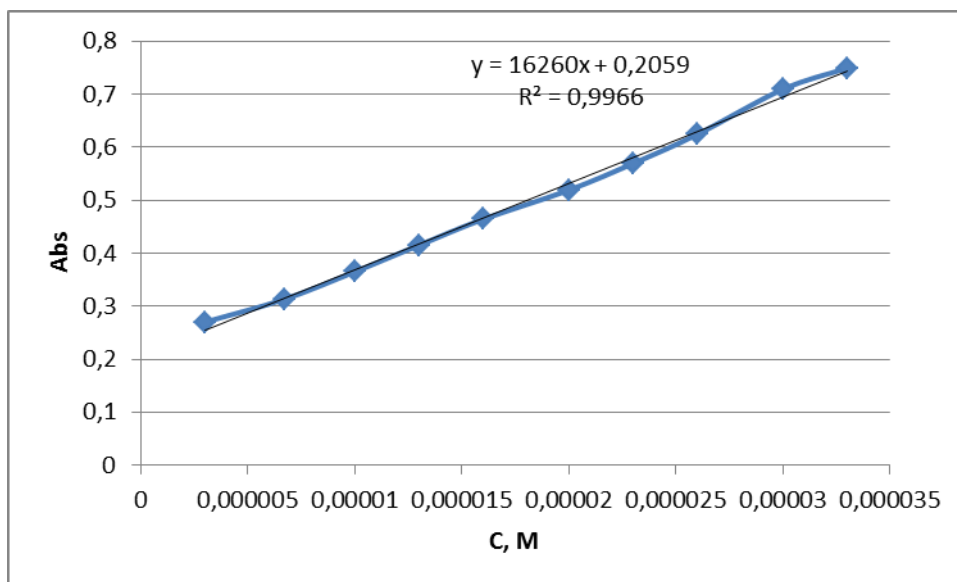


Рис. 7 - Зависимость аналитического сигнала коэнзима Q₁₀ от концентрации

1 влияние веществ на аналитический сигнал

Препараты, основанные на коэнзиме Q₁₀, содержат помимо коэнзима и другие соединения, которые тоже могут влиять на аналитический сигнал коэнзима Q₁₀. Исследовали влияние сопутствующих веществ БАД на аналитический сигнал коэнзима Q₁₀. Соединениями, растворяющихся в гексане, оказались витамин Е и ДГК. В ходе эксперимента выяснили, что на аналитический сигнал коэнзима Q₁₀ сопутствующие вещества не влияют.

Таблица 5. Результаты количественного определения коэнзима Q₁₀ в реальных объектах методом введено-найдено (P = 0,95, n = 3)

Название	Название вещества	Соотнош. CoQ ₁₀ , См, М	Введено CoQ ₁₀ , См, М	Найдено CoQ ₁₀ , См, М
Кудесан раствор (Эвалар, Россия)	Витамин Е	1:2	0,1	0,097 ± 0,024
	ДГК	5:1	0,1	0,93 ± 0,03
Кудесан форте	Витамин Е	1:2	0,1	0,097 ± 0,024

раствор (Аквион, Россия)				
Тайм эксперт (Эвалар, Россия)	Витамин Е	1:2	0,1	$0,097 \pm 0,024$

Правильность методики количественного анализа определения коэнзима Q₁₀ в модельных растворах проверяли методом «введено-найдено» в табл. 6.

Таблица 6. Результаты количественного определения коэнзима Q₁₀ в реальных объектах методом введено-найдено (P = 0,95, n = 3)

Введено, $C_m \cdot 10^5$, М	Найдено, $C_m \cdot 10^5$, М	ε, %
0,5	$0,52 \pm 0,3$	4
0,25	$0,27 \pm 0,7$	8
0,45	$0,44 \pm 2,2$	2,2
0,65	$0,67 \pm 3,7$	3,07
0,85	$0,86 \pm 6,1$	1,17
0,95	$0,92 \pm 8,9$	3,2

Результаты

В настоящее время для качества БАД сформулированы требования в нормативных документах, что любое лекарственное средство должно соответствовать таким критериям, как безопасность, эффективность и качество, поэтому сейчас актуальной задачей является контроль над качеством БАД. По окончании исследования определили содержание коэнзима Q₁₀ в БАД-ах с помощью спектрофотометрического и вольтамперометрического методами. Результаты приведены в табл.7.

Таблица 7. Найденные значения концентраций коэнзима Q10 в БАД-ах, определенные вольтамперометрическим и спектрофотометрическим методами (P = 0,95; n = 3)

Название объектов исследования	Содержание по ТУ, См, мМ	Вольтамперометрический метод, См, мМ	Спектрофотометрический метод, См, мМ	T критерий (Фишера)
Кудесан раствор (Эвалар, Россия)	34 ± 3	29,7 ± 4,2	31,6 ± 3,6	
Кудесан форте раствор (Аквион, Россия)	70 ± 6	72,3 ± 7,2	71,9 ± 6,8	
Тайм эксперт (Эвалар, Россия)	34 ± 3	34,8 ± 3,9	31,7 ± 3,5	

Сравнили найденные значения содержания коэнзима Q₁₀ с техническими условиями, результаты соответствуют дозировке препарата и находится в допустимых пределах по ТУ.

Обсуждение результатов

Выводы

1. Показано влияние рН фонового электролита на электрохимический сигнал коэнзима Q₁₀. Установлено, что с увеличением кислотности среды ток окисления увеличивается, а восстановления уменьшается. Также с изменением рН среды происходит сдвиг потенциалов пиков окисления и восстановления коэнзима Q₁₀ в соответствии с уравнением Нернста.
2. Найдены диапазоны линейной зависимости аналитического сигнала коэнзима Q₁₀ от концентрации для спектрофотометрической (от 1·10⁻⁶ до 5·10⁻⁵ М) и вольтамперометрической (от 5·10⁻⁵ до 1·10⁻⁴ М) методик.
3. Показано, что в присутствии аскорбиновой кислоты и витамина В₆ происходит увеличение аналитического сигнала коэнзима Q₁₀ при его определении вольтамперометрическим методом. Предложена схема пробоподготовки реальных объектов для устранения мешающего влияния данных веществ.
4. Определено содержание коэнзима Q₁₀ в БАД-ах методами спектрофотометрии и вольтамперометрии, показана хорошая сходимость результатов друг с другом. Установлено, что содержание коэнзима Q₁₀ во всех исследуемых БАД-ах соответствует техническим условиям.

Список использованной литературы

1. Нормативные документы по БАД [Электронный ресурс].– Режимдоступа: http://sportwiki.to/Нормативные_документы_по_биологически-активным_добавкам, - Загл. с экрана.
2. Коэнзим q10 (Убихинон) [Электронный ресурс].– Режимдоступа: <http://chimiya-krasoty.livejournal.com/>, - Загл. с экрана.
3. КОЭНЗИМ Q10: ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ Макарова Т.П., Батыршина С.В., Данилова Н.И. Журнал: Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. Выпуск № 206 / 2011
4. Mellors A. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol / A. Mellors, A.L. Tappel // J Biol Chem. – 1966. – V. 241 (19). – P. 4353-4356.
5. Mellors A. Quinones and quinols as inhibitors of lipid peroxidation / A. Mellors, A. L. Tappel // Lipids. – 1966. – V. 1 (4). – P. 282-284.
6. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol. 2003;552:335-344.
7. Chen Q., Vazquez E.J., Moghaddas S., Hoppel C.L., Lesnefsky E.J. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. J Biol Chem. 2003;278:36027-36031.
8. Madamanchi N.R. and Runge M.S. Mitochondrial Dysfunction in Atherosclerosis Circ. Res. 2007;100:460-473.
9. Littarru G.P. Energy and defense. Facts and perspectives on coenzyme Q10 in biology and medicine. // Casa Editrice Scientifica Internazionale. – 1994. – pp. 1–91.
10. Belliere J. Prerequisites for ubiquinone analogs to prevent mitochondrial permeability transition-induced cell death / J. Belliere, F. Devun, C. Cottet-Rousselle, C. Batandier, X. Leverve, E. Fontaine // J Bioenerg Biomembr. – 2012. – V. 44 (1). – P. 207-212.

11. Finckh B. Monitoring of ubiquinol-10, ubiquinone-10, carotenoids, and tocopherols in neonatal plasma microsomes using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection / B. Finckh, A. Kontush, J. Commentz, C. Hubner, M. Burdelski, A. Kohlschutter // *Anal Biochem.* – 1995. – V. 232 (2). – P. 210-216.
12. 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.
13. Dhandayuthapani S. Quinones in *Penetrocephalus ganapatii* (Cestoda: Pseudophyllidea) / Nellaiappan K., Ramalingam K. // *J. Parasitol.* – 1983. – Vol. 68. – pp. 996-998.
14. Weber C. Coenzyme Q10 in diet daily intake and relative bioavailability. / Bysted A., Holmer G. // *Mol. Aspects Med.* – 1997. – Vol. 18. – pp. 251-254.
15. 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.
16. Kubo H. Food content of ubiquinol-10 and ubiquinone-10 in the Japanese diet / Fujii K., Kawabe T., Matsumoto S. // *Food Comp. Anal.* – 2008. – Vol. 21. – pp. 199 – 210.
17. 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.

18. 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.
19. Дерябина В.И. «Вольтамперометрический контроль кормов и кормовых добавок на показатели токсичности и биологической ценности», Томск -2013
20. Yuangang Zu, Chunjian Zhao, Chunying Li, Lin Zhang. A rapid and sensitive LC-MS/MS method for determination of coenzyme Q10 in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. Pages 1607–1612. 2006