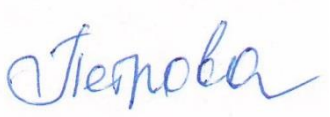
На правах рукописи



Петрова Екатерина Викторовна

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЭНЗИМА Q_{10} В ПРОДУКЦИИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ И КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ МЕТОДОМ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ

02.00.02 – аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Томск-2015

Работа выполнена на кафедре физической и аналитической химии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Научный руководитель:	доктор химических наук, доцент, Короткова Елена Ивановна
Официальные оппоненты:	Стожко Наталия Юрьевна доктор химических наук, профессор, Уральский государственный экономический университет, кафедра физики и химии, заведующая кафедрой
	Шелковников Владимир Витальевич кандидат химических наук, доцент, Национальный исследовательский Томский государственный университет, кафедра аналитической химии, доцент
Ведущая организация:	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Казанский (Приволжский) федеральный университет.

Защита состоится «16» декабря 2015 г. в 14:30 на заседании диссертационного совета Д.212.269.04 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» по адресу: 634050, г. Томск пр. Ленина, 43а, 2-й корпус ТПУ, Малая химическая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в Научно–технической библиотеке ФГАОУ ВО НИ ТПУ по адресу: 634050, г. Томск, ул. Белинского, 55 и на сайте http://portal.tpu.ru/council/911/worklist

Автореферат разослан «18» октября 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д.212.269.04 Т. М. Гиндуллина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Коэнзим Q_{10} является важным компонентом окислительно - восстановительной цепи митохондрий, а также единственным жирорастворимым антиоксидантом, синтезируемым в организме человека. CoQ_{10} 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_{10} в организме. После 35 лет уменьшается способность организма генерировать коэнзим Q_{10} из продуктов питания и развивается его дефицит в организме. Все это приводит к потребности в дополнительном приеме коэнзима Q_{10} в виде биологически активных добавок (БАД). По результатам многих клинических исследований показана положительная тенденция применения БАД на основе коэнзима Q_{10} 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 Поэтому контроль качества БАД является актуальной задачей.

Коэнзим Q_{10}, являясь эффективным антиоксидантом, широко используется в косметической промышленности. В составе косметических средств по уходу за кожей лица и тела коэнзим Q_{10} 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. Однако, электроаналитические методы, в частности вольтамперометрия, имея

высокую чувствительность и простоту аппаратурного 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 СУЭ электроде. Предложить механизм протекания реакции окисления-восстановления коэнзима 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, pH 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 косметическим 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.

Публикации. Основное содержание диссертационной работы опубликовано в 9 научных работах, в том числе одна статья в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, две статьи в научных изданиях, входящих в базу данных Scopus и 6 публикаций в материалах международных и всероссийских конференций.

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 соглашения – «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.B37.21.0811, (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.B37.21.1183, (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.)

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 6-ти глав, выводов, списка литературы (140 ссылок) и приложений. Работа изложена на 140 страницах машинописного текста, включая 35 рисунков и 11 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, сформулирована цель исследований, показана научная новизна и практическая значимость работы.

В первой главе описана история открытия коэнзима Q_{10}. Представлены основные биохимические функции, выполняемые коэнзимом Q_{10} в организме: перенос электронов в дыхательной цепи митохондрий и антиоксидантная. Приведены сведения о физико-химических свойствах коэнзима Q_{10}, отмечена его способность к окислительно-восстановительным превращениям. Систематизированы сведения об основных методах определения коэнзима Q_{10}: хроматографических, спектрофотометрических и электрохимических. Показаны преимущества и недостатки существующих на данный момент методов определения коэнзима Q_{10}. Показаны преимущества применения вольтамперометрических методов для определения коэнзима Q_{10} в фармацевтических и косметических препаратах.

Вторая глава посвящена описанию используемой аппаратуры и методик измерений. Описаны объекты исследования, состав косметических средств и биологически активных добавок, используемых в анализе. Исследования проводились на вольтамперометрическом анализаторе «ТА-2» (ООО «Томьаналит» г. Томск) в трехэлектродной ячейке, где в качестве рабочего использовали стеклоуглеродный электрод, хлорид – серебряные электроды как сравнения и вспомогательный электроды.

В третьей главе описаны физико-химические закономерности протекания реакции восстановления коэнзима Q_{10} на стеклоуглеродном электроде в водных средах, подобраны оптимальные условия определения коэнзима Q_{10} в продукции косметической и фармацевтической промышленности.

Четвертая глава посвящена исследованию антиоксидантной активности коэнзима Q_{10}, используя процесс электровосстановления кислорода в качестве модельного процесса.

В пятой главе рассмотрено влияние веществ различной природы на аналитический сигнал коэнзима Q_{10} в модельных средах. Показано, что наибольшее влияние оказывают витамин С, витамин B_1 и гиалуроновая кислота.

Шестая глава посвящена разработке вольтамперометрической методики определения коэнзима Q_{10} в продукции косметической и фармацевтической промышленности методом вольтамперометрии, установлены основные метрологические характеристики разработанной методики. Определено содержание коэнзима Q_{10} в косметических средствах и БАД вольтамперометрическим и спектрофотометрическим методами.

Результаты и обсуждение

При создании любой аналитической 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 pH раствора.

Как убихинон (окисленная форма коэнзима Q_{10}), так и убихинол (восстановленная форма коэнзима Q_{10}) хорошо растворимы в следующих растворителях: ацетоне, диэтиловом эфире, хлороформе, этаноле. В последующем для приготовления стандартных растворов, а также процесса экстракции в качестве растворителя использовали этанол. Для получения воспроизводимого аналитического сигнала коэнзима Q_{10} исследовали влияние материала индикаторного электрода. В условиях постоянно-токовой развертки потенциала получили аналитический сигнал коэнзима на стеклоуглеродном электроде (СУЭ), в дальнейшем принято использовать его в качестве индикаторного электрода. В качестве электродов сравнения и вспомогательного использовали хлоридсеребрянные электроды (ХСЭ).

Выбор фонового электролита. Аналитический сигнал коэнзима Q_{10} на СУЭ получили при использовании в качестве фонового электролита

фосфатного буферного раствора pH 6.86 (рис. 1) и безводного ацетонитрила (0.1 М раствор $NaClO_4$) (рис. 2)

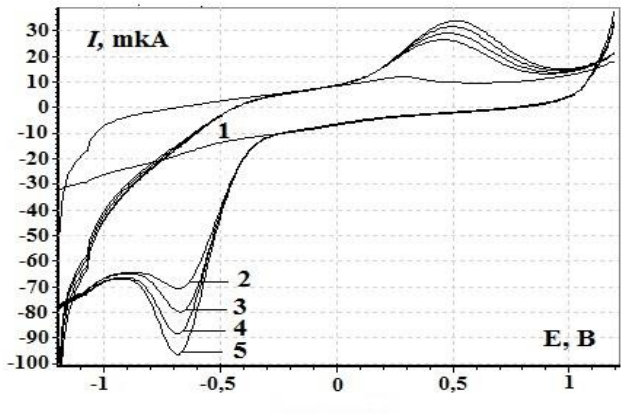


Рисунок 1. Циклические вольтамперограммы коэнзима Q_{10} на СУЭ в фосфатном буфере (pH 6.86) (**1**) при разных значениях концентрации CoQ_{10} в электрохимической ячейке: 10 (**2**), 20 (**3**), 30 (**4**), 40 (**5**) μM CoQ_{10}. Скорость развертки потенциала 100 мВ·с$^{-1}$.

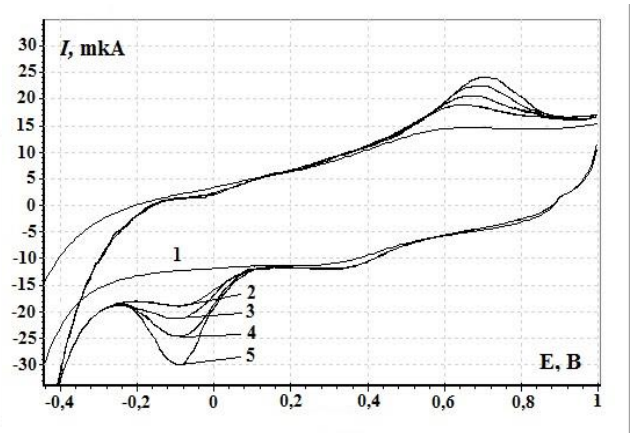


Рисунок 2. Циклические вольтамперограммы коэнзима Q_{10} на СУЭ в безводном ацетонитриле (0.1 М $NaClO_4$) (**1**) при разных значениях концентрации CoQ_{10} в электрохимической ячейке: 10 (**2**), 20 (**3**), 30 (**4**), 40 (**5**) μM CoQ_{10}. Скорость развертки потенциала 100 мВ·с$^{-1}$.

На рисунке 3 представлена зависимость высоты аналитического сигнала коэнзимам Q_{10} в зависимости от типа буферного раствора.

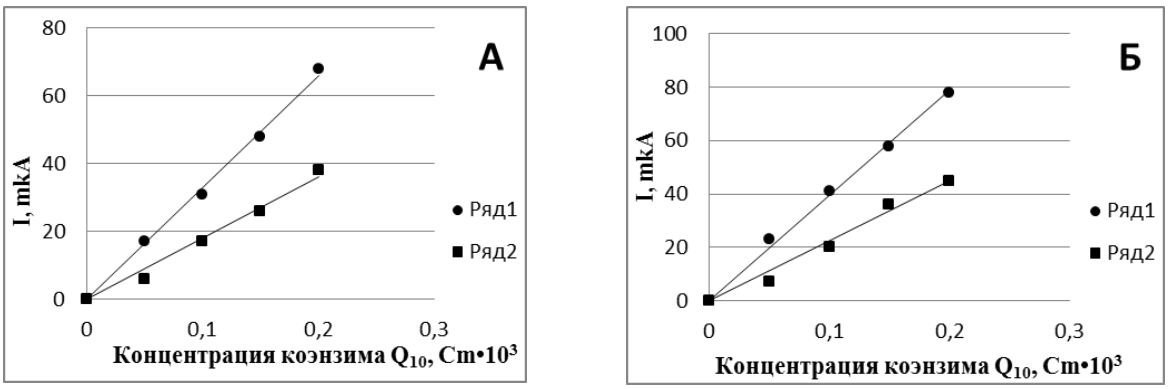


Рисунок 3. Зависимость предельного тока восстановления (**А**) и окисленния (**Б**) в зависимости от природы фонового электролита (**1** – фосфатный буферный раствор pH 6.86; **2** – безводный ацетонитрил (0.1 М раствор $NaClO_4$)

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.

В дальнейшем, для создания вольтамперомнтрической методики определения коэнзима Q_{10} в косметических и фармацевтических препаратах, установили использовать водные буферные растворы для стабилизации аналитического сигнала, улучшения его воспроизводимости, а также для увеличения чувствительности разрабатываемой методики.

Выбор pH фонового электролита.

Для определения оптимального фонового электролита для аналитического определения коэнзима Q_{10} готовили фоновые буферные растворы со следующими значениями pH: 4.80, 6.86, 8.0. Эксперимент проводился в условиях постоянно-токовой вольтамперометрии. В качестве индикаторного электрода использовали СУЭ.

Влияние pH фонового электролита на электрохимический сигнал окисления-восстановления коэнзима Q_{10} приведено на рисунке 4.

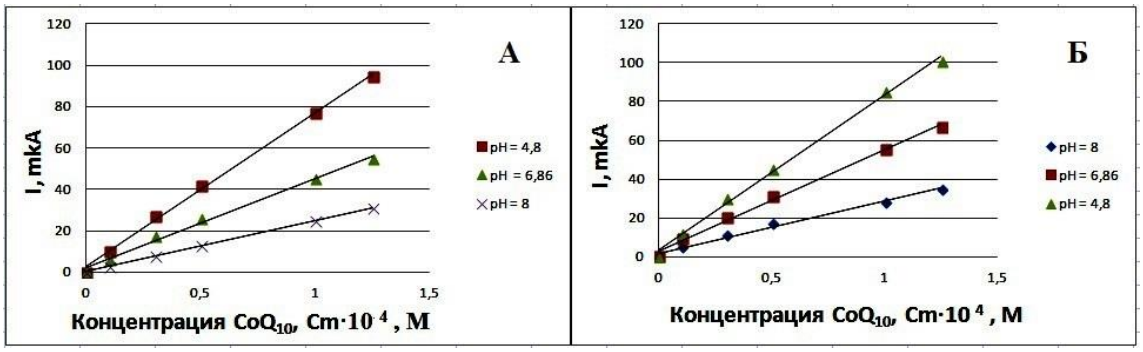


Рисунок 4. Зависимость предельного тока окисления (**А**) и восстановления (**Б**) коэнзима Q_{10} от его концентрации на СУЭ при разных значениях pH среды.

Из рисунка 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 (-OH) гидрохинонной части молекулы коэнзима Q_{10}, и как следствие облегчение процесса восстановления.

Известно, что молекула коэнзима Q_{10} чувствительна к физико-химическим воздействиям, например, в щелочной и кислой среде, а также под действием света она становится нестабильна и начинает самопроизвольно трансформироваться. Поэтому, для создания методики в качестве фонового электролита приняли использовать фосфатный буферный раствор с pH 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,

Физико-химические закономерности протекания реакции окисления - восстановления коэнзима Q_{10} на стеклоуглеродном электроде

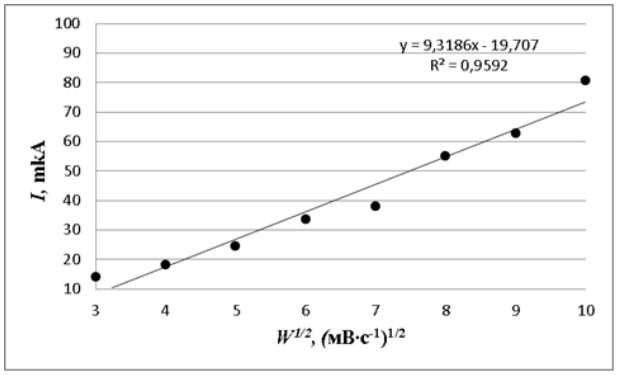


Рисунок 5. График зависимости высоты тока восстановления CoQ_{10} от скорости развертки потенциала в степени 1/2 в фосфатном буферном растворе на СУЭ. Концентрация CoQ_{10} $5 \cdot 10^{-5}$ М.

Для исследования обратимости электрохимического сигнала восстановления коэнзима Q_{10} получили зависимость тока электровосстановления коэнзима Q_{10} от $W^{1/2}$ (рис. 5). Представленная на рисунке 5 зависимость $I=f(W^{1/2})$ имеет нелинейный характер, что указывает на квазиобратимость электрохимического процесса восстановления коэнзима Q_{10} на СУЭ.

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

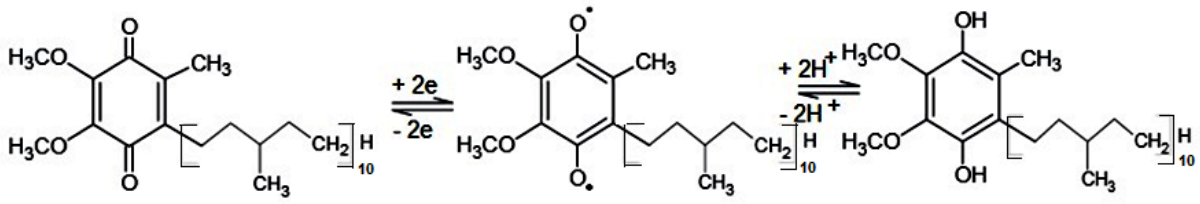


Рисунок 6. Процесс окисления-восстановления коэнзима Q_{10}.

Как видно из схемы протекания процесса (рис. 6), электродный процесс сопровождается наличием последующей химической реакции.

Наличие последующей химической реакции, как для обратимого, так и необратимого электродных процессов можно определить по следующим критериям:

1. Линейной зависимости потенциала пика от логарифма $W^{1/2}$ (в случае обратимых и квазиобратимых процессов);

2. Сдвига потенциала в область положительных значений при уменьшении скорости развертки потенциала.

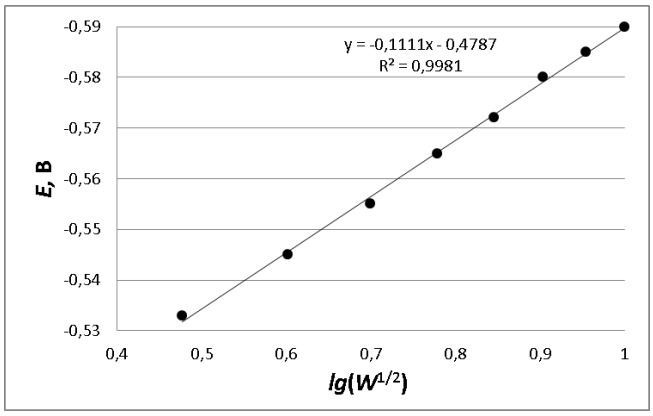


Рисунок 7. Зависимость потенциала предельного тока ЭВ CoQ_{10} от логарифма скорости развертки потенциала в степени ½. Концентрация CoQ_{10} $5 \cdot 10^{-5}$ М

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. 7).

На рисунке 8 представлена вольтамперограмма тока электровосстановления (ЭВ) коэнзима Q_{10} в водной нейтральной среде на СУЭ при $W = 30$ и 300 мВ/с.

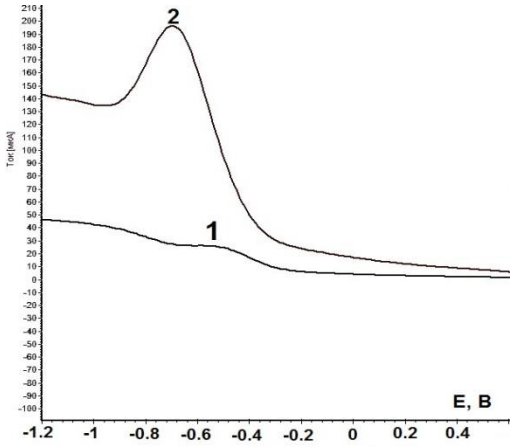


Рисунок 8. Вольтамперограмма тока ЭВ CoQ_{10} в фосфатном буфере (pH = 6.86) на СУЭ при скорости развертки 30 мВ/сек (**1**) и 300 мВ/сек (**2**). Концентрация CoQ_{10} $9 \cdot 10^{-4}$ М.

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

Таким образом, в данной главе исследовали закономерности восстановления коэнзима Q_{10} на СУЭ. Показано, что на поверхности электрода идет квазиобратимый процесс осложненный наличием последующей химической реакции (рис. 6)

Исследование антиоксидантной активности коэнзима Q_{10}.

В данной работе для исследования антиоксидантных свойств коэнзима Q_{10} использовали вольтамперометрический метод, основанный на модельной реакции электровосстановления кислорода на ртутно-пленочном электроде в области потенциалов от 0 до -1.2 В протекающий по следующему механизму:

$$O_2 + e \leftrightarrow O_2^{\bullet -}$$

$$O_2^{\bullet -} + H^+ \leftrightarrow H\,O_2^{\bullet}$$

При введении коэнзима Q_{10} в электрохимическую ячейку на поверхности электрода происходила следующая реакция взаимодействия коэнзима с кислородом:

$$CoQH_2 + O_2^{\bullet -} \rightarrow CoQH^{\bullet} + HO_2^{\bullet}$$

$$CoQH^{\bullet} + HO_2^{\bullet} \rightarrow CoQ + H_2O_2$$

Для оценки антиоксидантной активности коэнзима Q_{10} в зависимости от его концентрации в электрохимической ячейке строили зависимости относительного изменения предельного тока ЭВ O_2 от времени взаимодействия коэнзима Q_{10} с активными кислородными радикалами:

$$(1 - \frac{Ii}{Io}) = f(t)$$

Степень уменьшения тока ЭВ O_2 являлась показателем антиоксидантной активности исследуемых веществ. По тангенсу угла наклона полученных зависимостей были определены коэффициенты антиоксидантной активности коэнзима Q_{10} в зависимости от концентрации по кинетическому критерию $K_{кин}$ (мкмоль/л·мин):

$$K_{кин} = \left(1 - \frac{I_i}{I_o}\right) \cdot \frac{C^o_{O_2}}{t}$$

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;

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

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

Результаты определения антиоксидантной представлены на рисунке 9.

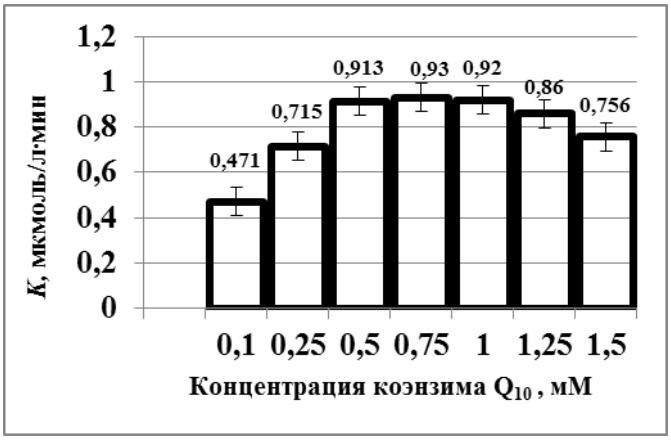


Рисунок 9. Значения показателя антиоксидантной активности коэнзима Q_{10} в зависимости от его концентрации в растворе.

Как видно из рисунка 9 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^3. 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.

Влияния соединений различной природы на аналитический сигнал коэнзима Q_{10}.

В ходе дальнейших исследований изучили влияние антиоксидантов и витаминов различной природы, наиболее часто встречающихся в кремах и БАД, на аналитический сигнал коэнзима Q_{10}. В качестве объектов исследования выбрали следующие вещества: витамин С, витамины группы В (B_1, B_6, B_{12}), гиалуроновая кислота, глутатион, бензоат натрия. Исследования проводили в условиях постояннотоковой анодной вольтамперометрии, в качестве индикаторного электрода использовали СУЭ, в качестве электрода сравнения и вспомогательного электрода – ХСЭ. Фоновый электролит – фосфатный буферный раствор pH 6.86. Область потенциалов от -1.2 до 1.2 В, скорость развертки потенциала 100 мВ/сек. Увеличение аналитического сигнала коэнзима Q_{10} свидетельствует о том, что при введении исследуемого вещества в модельный раствор коэнзима Q_{10}, происходит его восстановление.

При съемке вольтамперограмм окисления модельных растворов коэнзима Q_{10} в присутствии исследуемых веществ, увеличение аналитического сигнала наблюдалась в присутствии витамина С, витамина B_1 и гаилуроновой кислоты (рис. 10).

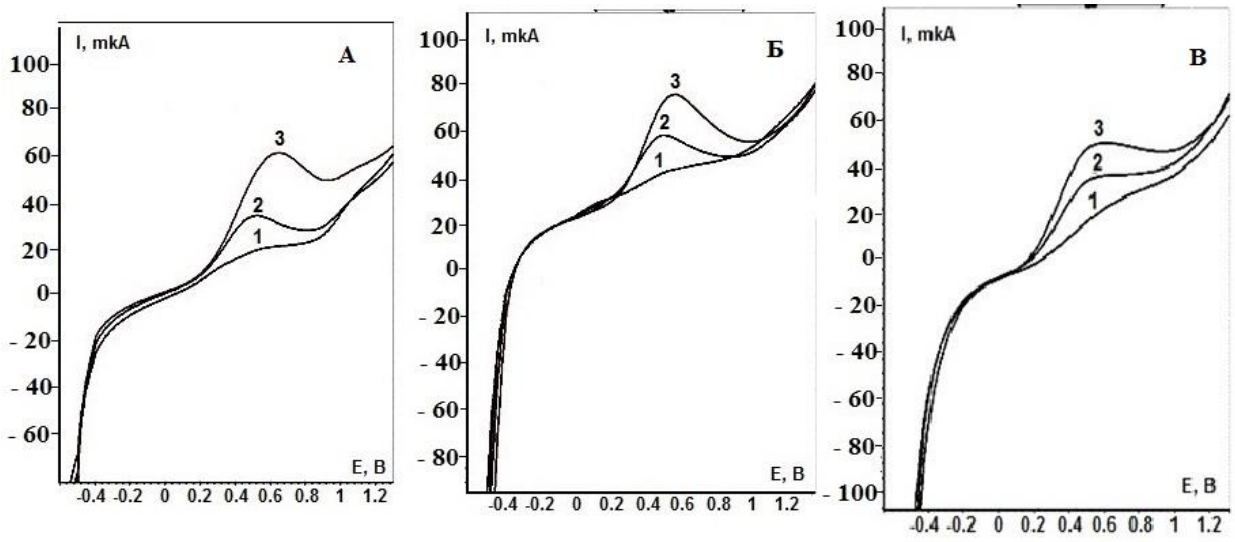


Рисунок 10. Вольтамперограммы электроокисления коэнзима Q_{10} – **2** (C_m = 0,0012 г/дм^3); в присутствии витамина С (C_m = 0,025 г/дм^3) – **А**; в присутствии витамина B_1 (C_m = 0,065 г/дм^3) – **Б**; в присутствии гиалуроновой кислоты (C_m = 0.055 г/дм^3) – **В.**

В таблице 1 представлены обобщенные результаты по влиянию веществ различной природы на аналитический сигнал коэнзима Q_{10}.

Таблица 1. 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^3: г/дм^3)	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 B_1	1:30	30.2 ± 4.0	40,7 ± 8,1
Витамин B_6	1:40	30.9 ± 4.6	29.7 ± 4.5
Витамин B_{12}	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

Как показали результаты экспериментов, такие вещества как: витамин С, витамин B_1 и гиалуроновая кислота способны восстанавливать коэнзим. 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 B_1, гиалуроновой кислоты устраняется на стадии пробоподготовки при осаждении в осадок веществ, не растворимых в этаноле.

Разработка вольтамперометрической методики определения коэнзима Q_{10} в фармацевтических и косметических препаратах

Для разработки методики определения содержания коэнзима Q_{10} в объектах косметической и фармацевтической промышленности был использован аналитический сигнал коэнзима Q_{10} при анодной развертке потенциала при E = 0.5 В на СУЭ в области линейной зависимости предельного тока окисления коэнзима Q_{10} от его концентрации в растворе. Это область находилась в диапазоне концентраций от $0.05 \cdot 10^{-3}$ до $1 \cdot 10^{-3}$ моль/дм^3 (рис. 11). Предел обнаружения коэнзима Q_{10} составил $5 \cdot 10^{-5}$ моль/дм^3.

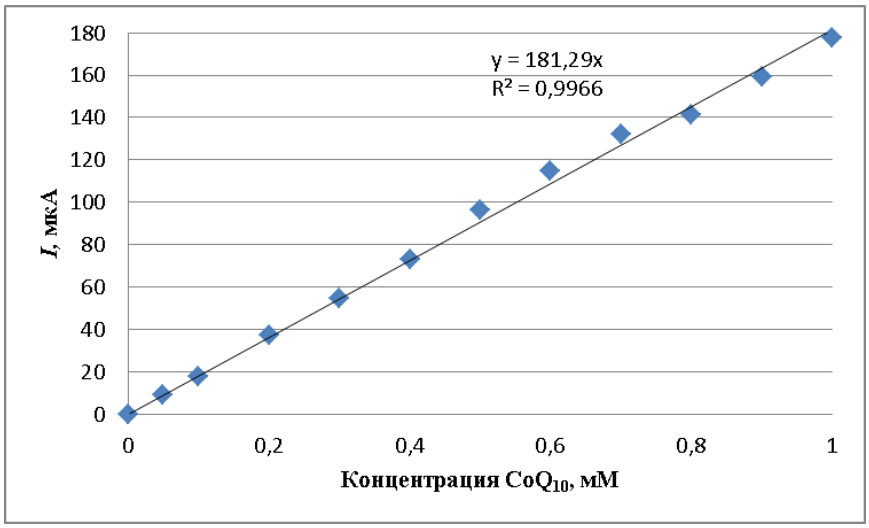


Рисунок 11. Градуировочный график зависимости аналитического сигнала коэнзима Q_{10} от его концентрации в фосфатном буферном растворе pH 6.86 на СУЭ

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 0.001 г (или с помощью дозатора отбирали 5 см^3 исследуемого БАД), вносили в колбу объемом 50 см^3, растворяли навеску пробы в 50 мл 96-% этилового спирта. Полученный раствор нагревали в термостате до температуры 35^{0}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^3.

Все измерения проводились на вольтамперометрическом анализаторе «ТА-2» (ООО «Томьаналит» г. Томск) с подключенной к нему трехэлектродной ячейкой, состоящей из индикаторного СУЭ, хлорид-серебрянных электродов сравнения и вспомогательного. Использовали постоянно-токовую вольтамперометрию со скоростью развертки потенциала 100 мВ/с. Оптимальным фоном являлся фосфатный буферный раствор с pH 6.86. Для количественного определения содержания коэнзима Q_{10} в косметических и фармацевтических препаратах сначала 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 методом добавок

Правильность методики количественного химического анализа определения коэнзима Q_{10} в модельных растворах проверялась методом «введено-найдено» (таблица 2).

Таблица 2. Результаты количественного определения коэнзима Q_{10} в модельных средах (P = 0.95, n = 3).

Введено, $C \cdot 10^5$ моль/дм3	Найдено, $C \cdot 10^5$ моль/дм3	ε, %
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 таблицы 2 следует, что данные, полученные по предлагаемой методике удовлетворительны.

Определены следующие метрологические характеристики методики:

1. Показатель повторяемости

2. Показатель внутрилабораторной прецизионности

3. Показатель точности методики

Обобщенные результаты показателей качества методики для диапазона исследуемых концентраций коэнзима, приведены в таблице 3.

Таблица 3. Значение 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), ±Δ, %
	Показатель повторяемости, σ_r, %	Показатель воспроизводимости σ_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.

Используя разработанную вольтамперометрическую методику определили содержание коэнзима Q_{10} в БАД и косметических продуктах, в качестве метода сравнения использовался спектрофотометрический метод.

В таблице 4 представлены результаты определения содержания коэнзима Q_{10} в косметических средствах.

Таблица 4. Найденные значения концентрации коэнзима Q_{10} в косметических кремах, определенные вольтамперометрическим и спектрофотометрическими методами (n=3, P=0.95)

Наименование крема	Вольтамперометрический метод $C_м \cdot 10^5$, моль/дм^3	Спектрофотометрический метод $C_м \cdot 10^5$, моль/дм^3
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_{10}	9.20 ± 4.6	8.90 ± 3.56

По результатам исследований найдено низкое содержание коэнзима Q_{10} в таких кремах как Тайм Эксперт Коэнзим Q_{10} форте и Nivea Q_{10} plus. Низкое содержание коэнзима Q_{10} 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 Q_{10} в крема.

В таблице 5 представлены результаты по определению содержания коэнзима Q_{10} в БАД.

Таблица 5. Найденные значения концентрации коэнзима Q_{10} в биологически-активных добавках, определенные вольтамперометрическим и спектрофотометрическими методами (n=3, P=0.95)

Исследуемый БАД	Содержание по сертификату, $C_m \cdot 10^4$, моль/дм^3	Допускаемые отклонения по ТУ, $C_m \cdot 10^4$, моль/дм^3	Вольтамперометрический метод, $C_m \cdot 10^4$, моль/дм^3	Спектрофотометрический метод, $C_m \cdot 10^4$, моль/дм^3
«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 5, содержание коэнзима Q_{10} во всех двух формах БАД соответствовало заявленной дозировке, находясь в пределах допустимых в ТУ пограничных значений.

ВЫВОДЫ

1. Изучены физико-химические закономерности протекания реакции окисления - восстановления коэнзима Q_{10} на поверхности СУЭ. Предположено, что на СУЭ электроде 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 аналитический сигнал коэнзима Q_{10} оказывают витамин С, гиалуроновая кислота и витамин B_1.

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 pH 6.86 в качестве фонового электролита. Определения проводились в диапазоне концентраций от $0.05 \cdot 10^{-3}$ до $1 \cdot 10^{-3}$ моль/дм^3.

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

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Воронова О. А Имунноферментный и вольтамперометрический методы анализа суммарной активности антиоксидантов в плазме крови при сердечно-сосудистой патологии / Воронова (Аврамчик) О. А., Короткова Е. И., Плотников Е. В., Гусакова А. М., Суслова Т. Е., Дорожко Е. В., **Петрова Е. В.**, Кустова (Якименко) А. А. // Фундаментальные исследования. - 2013 - №. 8-3. - С. 570-574

2. **Petrova E. V.** Investigation of Coenzyme Q_{10} by Voltammetry / **Petrova E. V.**, Korotkova E. I., Kratochvil B., Voronova O. A., Bulycheva E. V., Dorozhko E. V. // Procedia Chemistry. - 2014 - Vol. 10. - p. 173-178

3. Dimitrova S. Production of Metabolites with Antioxidant and Emulsifying Properties by Antarctic Strain *Sporobolomyces salmonicolor* AL_1 / Dimitrova S., Pavlova K., Lukanov L., Korotkova E. I., **Petrova E. V.,** Zagorchev P., Kuncheva M. // Applied Biochemistry and Biotechnology. - 2013 - Vol. 169 - №. 1. - p. 301-311

4. **Петрова Е. В.** Одновременное определение окисленной и восстановленной формы коэнзима Q_{10} методом вольтамперометрии / **Петрова Е. В.,** Воронова (Аврамчик) О. А., Булычева Е. В. // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва: в 2 т., Томск, 26-29 Мая 2014. - Томск: ТПУ, 2014 - Т. 1 - С. 220-222

5. **Петрова Е. В**. Разработка методики определения коэнзима Q_{10} в фармацевтических препаратах вольтамперометрическим методом / **Петрова Е. В.,** Воронова (Аврамчик) О. А., Короткова Е. И. // Новые методы аналитической химии : Первая Зимняя молодежная школа-конференция с международным участием, Санкт-Петербург, 17 Февраля-22 Марта 2013. - СПб: Соло, 2013 - С. 86.

6. **Петрова Е. В**. Электрохимические свойства коэнзима Q_{10} на стеклоуглеродном электроде / **Петрова Е. В.,** Воронова (Аврамчик) О. А. //

Менделеев - 2013: сборник тезисов докладов VII Всероссийской конференции молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием по химии и наноматериалам , Санкт-Петербург, 2-5 Апреля 2013. - СПб: Соло, 2013 - С. 141-143.

7. **Петрова Е. В**. Электрохимические свойства коэнзима Q_{10} / **Петрова Е. В.,** Воронова О. А. // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулева студентов и молодых ученых с международным участием: в 2 т., Томск, 13-16 Мая 2013. - Томск: ТПУ, 2013 - Т. 1 - С. 281-283

8. **Petrova E. V**. Voltammetric determination of coenzyme Q_{10} / **Petrova E. V.,** Voronova O. A., Retinsky K. P. // Problems of Geology and Subsurface Development: Proceedings of the 17-th International Sientific Symposium of Students, postgraduates and young Scientists devoted to the 150-th Anniversary of Academician V.A. Obruchev and 130-th Anniversary of Academician M.A. Usov, Founders of Siberian Mining School, Tomsk, April 1-6, 2013. - Tomsk: TPU Press, 2013 - Vol. 2 - p. 828-830.

9. **Petrova E. V**. Electrochemical determination of coenzyme Q_{10} / Dorozhko E. V., **Petrova E. V.,** Voronova O. A., Bulycheva E. V., Dyorina K. V. // Euroanalysis XVII: Analytical chemistry for human well being and sustainable development. Book of Abstract, Warsaw, August 25-29, 2013. – Warsaw: BEL Studio Sp. 2013 – p. 392.

Подписано в печать 13.10.2015. Тираж 100 экз.
Кол-во стр. 24. Заказ 32-15
Бумага офсетная. Формат А4. Печать RISO.
Отпечатано в типографии ООО «РауШ мбх»
634034, г.Томск, ул. Усова 7, оф. 046.
Тел. 8-9528074686