

УДК 543.5

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЭНЗИМА Q₁₀ В БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВКАХ

© Е. В. Петрова, Е. И. Короткова, О. А. Воронова¹*Статья поступила 5 февраля 2016 г.*

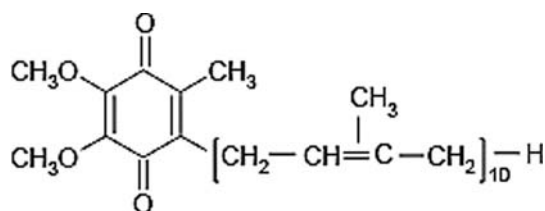
Представлена новая методика определения коэнзима Q₁₀ в водных средах методом постоянноточковой катодной вольтамперометрии на стеклоуглеродном электроде. Изучено влияние pH фонового электролита на процесс окисления-восстановления коэнзима Q₁₀, выбраны рабочие условия получения его аналитического сигнала. Диапазон определяемых концентраций коэнзима Q₁₀ составил от 10 до 100 мг/мл, предел определения — 0,01 мг/мл, что достаточно для определения коэнзима Q₁₀ в биологически активных добавках. Рассчитаны основные метрологические характеристики разработанной вольтамперометрической методики определения коэнзима Q₁₀. Проведен анализ различных биологически активных добавок, в качестве референтного использован метод спектрофотометрии.

Ключевые слова: коэнзим Q₁₀; постоянноточковая вольтамперометрия; стеклоуглеродный электрод; биологически активные добавки.

Коэнзим Q₁₀ (CoQ₁₀) является важным компонентом окислительно-восстановительной (дыхательной) цепи митохондрий, а также единственным жирорастворимым антиоксидантом, синтезируемым в организме человека. В 1970 г. в Японии разработали технологию промышленного производства CoQ₁₀, с тех пор началось его массовое производство в количествах, достаточных для проведения исследований по возможности применения CoQ₁₀ в клинической практике [1]. В настоящее время биологически активные добавки (БАД) на основе CoQ₁₀ широко используют при лечении сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний, заболеваний печени, сахарного диабета и многих других [2]. В России качественный и количественный состав производимых БАД строго регламентируется нормативными документами [3, 4].

Химическая структура CoQ₁₀ (2,3-диметокси-5-метил-6-полиизопрופן пара-бензохинон, изопреновая цепь находится в шестом положении) представлена на рис. 1. Из-за наличия боковой изопреновой цепи молекула CoQ₁₀ является гидрофобной, что делает его

труднорастворимым в воде и полярных растворителях, но хорошо растворимым в жирах и неполярных растворителях. Наличие же бензохинонового кольца в молекуле CoQ₁₀ способствует его быстрому окислению под действием кислорода воздуха. В щелочной среде, а также под действием света молекула CoQ₁₀ становится нестабильной и начинает самопроизвольно трансформироваться [5]. Все эти свойства делают определение CoQ₁₀ сложной аналитической задачей, для решения которой используют такие методы, как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с электрохимическим [6, 7], спектрофотометрическим [8], масс-спектрометрическим детектированием [9–13] и спектрофотометрия [14–17].

Рис. 1. Структурная формула CoQ₁₀

¹ Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия; e-mail: evp_89@mail.ru

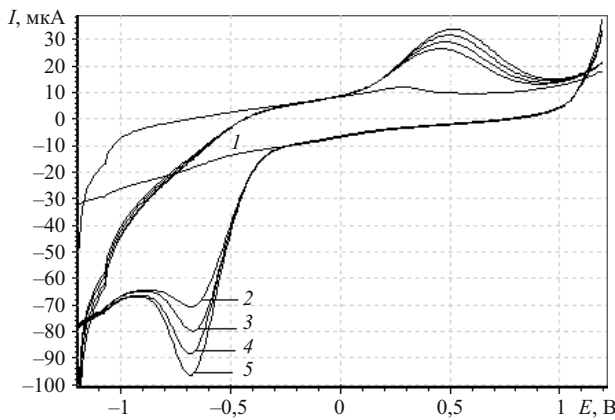


Рис. 2. Циклические вольтамперограммы окисления-восстановления CoQ_{10} на стеклоуглеродном электроде в фосфатном буферном растворе (рН 6,86) (1) при разных значениях концентрации CoQ_{10} (мг/мл) в электрохимической ячейке: 0,08 (2), 0,17 (3), 0,26 (4), 0,35 (5) (скорость развертки потенциала — 100 мВ/с)

Однако электрохимические методы [18–20], в частности, вольтамперометрию, отличающуюся высокой чувствительностью и простой аппаратурного оформления, можно использовать для определения CoQ_{10} в качестве альтернативных. Основными недостатками электрохимических методик являются использование токсичных растворителей и индикаторных ртутных электродов, а также трудоемкий процесс пробоподготовки, что предъявляет дополнительные требования к технике проведения анализа.

Цель работы — разработка вольтамперометрической методики определения CoQ_{10} для контроля его содержания в биологически активных добавках.

Объекты исследования. Стандартный раствор с концентрацией 0,1 мг/мл готовили путем растворения навески $\text{CoQ}_{10} \geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, США), взвешенной с погрешностью не более $\pm 0,0002$ г, в этиловом спирте с последующим нагреванием до температуры, не превышающей 35°C (растворимость коэнзима Q_{10} в этаноле при 35°C — 0,1 мг/мл). Рабочие растворы получали последовательным разбавлением стандартного раствора этанолом непосредственно перед работой.

В качестве объектов исследования использовали: БАД «Кудесан капли для приема внутрь 3%» (Аквирон, Россия, № ЛСР-003092/10) и БАД «Кудесан форте раствор» (Аквирон, Россия, патент РФ № 2290176). Помимо CoQ_{10} основным активным компонентом этих препаратов является токоферол ацетат.

Для определения CoQ_{10} необходимую навеску исследуемого образца помещали в мерную колбу объемом 50 см^3 , доводили до метки 96%-ным этиловым спиртом, нагревали до температуры, не превышающей 35°C , затем полученный раствор центрифугировали в течение 20 мин при скорости 4500 мин^{-1} . Далее полученный центрифугат анализировали вольтамперометрическим методом.

Все измерения проводили с помощью автоматизированного вольтамперометрического анализатора «ТА-2» (ООО «НПП Томьаналит», г. Томск) с подключенной к нему электрохимической ячейкой. В качестве вспомогательного электрода и электрода сравнения использовали хлоридсеребряные электроды, заполненные 1 М раствором KCl. Индикаторным служил стеклоуглеродный электрод. Перемешивание растворов осуществляли путем вибрирования индикаторного электрода.

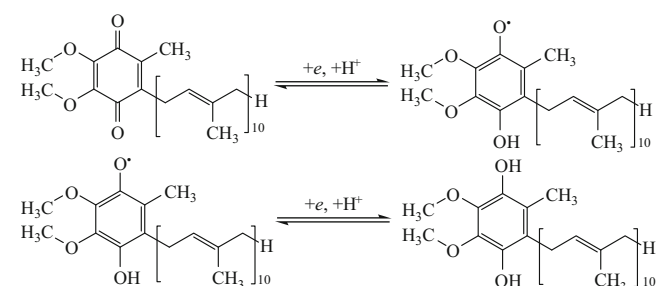
Вольтамперограммы регистрировали следующим образом. В электрохимическую ячейку, представляющую собой стеклянный стаканчик, помещали 10 см^3 фонового электролита — фосфатного буферного раствора с рН 6,86. Использовали постоянноточковый режим циклической вольтамперометрии, скорость развертки потенциала $W = 100\text{ мВ/с}$, рабочий диапазон потенциалов — от $-1,2$ до $1,2$ В. Вольтамперограмму фонового электролита регистрировали не менее трех раз. При отсутствии посторонних пиков фоновый раствор считался чистым. Затем при тех же условиях регистрировали вольтамперограмму исследуемого образца.

Перед регистрацией вольтамперограмм анализируемый раствор продували инертным газом (азотом) в течение 5 мин для деактивации растворенного кислорода.

При исследовании электрохимических свойств CoQ_{10} получена циклическая вольтамперограмма его окисления-восстановления на стеклоуглеродном электроде в фосфатном буферном растворе в области потенциалов $E = -1,2$ до $1,2$ В. При этом потенциал окисления CoQ_{10} составил $0,5$ В, потенциал его восстановления — $-0,6$ В (рис. 2).

При разработке вольтамперометрической методики определения CoQ_{10} в биологически активных добавках в качестве аналитического сигнала выбран ток электровосстановления CoQ_{10} .

На стеклоуглеродном электроде в водных средах процесс электровосстановления CoQ_{10} происходит при участии двух протонов и двух электронов с образованием промежуточного неустойчивого семихинонового радикала:



Для определения оптимального значения рН фонового электролита готовили фосфатный буферный раствор со следующими значениями рН: 4,80, 6,86, 8,0.

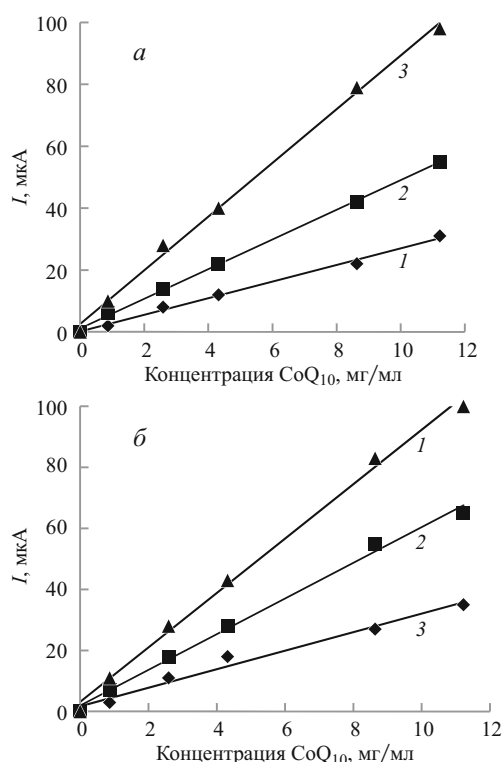


Рис. 3. Зависимость предельного тока окисления (а) и восстановления (б) CoQ_{10} от его концентрации при разных значениях pH среды: 1 — 4,8; 2 — 6,86; 3 — 8,0 (стеклоуглеродный электрод, скорость развертки потенциала — 100 мВ/с)

Механизм и скорость протекания электродного процесса при вольтамперметрическом определении CoQ_{10} в значительной степени зависят от pH среды. При увеличении кислотности среды анодный ток окисления увеличивается, а катодный ток восстановления уменьшается (рис. 3), что предположительно связано с изменением механизма электрохимического окисления-восстановления органического вещества с изменением pH. Из-за неустойчивости коэнзима Q_{10} в щелочной и кислой средах при разработке вольтамперметрической методики определения CoQ_{10} предпочтительнее использовать в качестве фонового электролита водные нейтральные среды.

При оценке влияния параметров электролиза на аналитический сигнал установлено, что оптимальное значение потенциала составляет $-1,2$ В (рис. 4), время электролиза — 60 с (рис. 5).

В результате проведенных исследований разработана методика определения CoQ_{10} методом катодной постоянно-токовой вольтамперметрии на стеклоуглеродном электроде. В стаканчик вместимостью 20 cm^3 вносят 10 cm^3 фосфатного буферного раствора (pH 6,86) и устанавливают в анализатор. Регистрируют вольтамперграммы фонового электролита при выбранных параметрах определения: потенциал электролиза $-1,2$ В, время электролиза — 60 с, скорость развертки потенциала — 100 мВ/с. Затем в электрохимическую ячейку вносят раствор CoQ_{10} и на катодной вольтамперграмме регистрируют пик его восстанов-

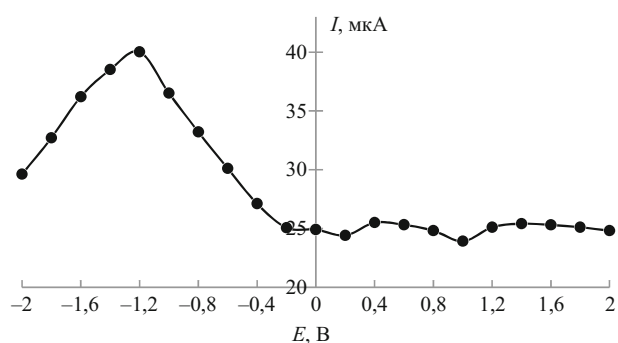


Рис. 4. Зависимость тока восстановления CoQ_{10} на стеклоуглеродном электроде от потенциала электролиза в фосфатном буферном растворе (pH 6,86; концентрация CoQ_{10} — 1 мг/мл; скорость развертки потенциала — 100 мВ/с)

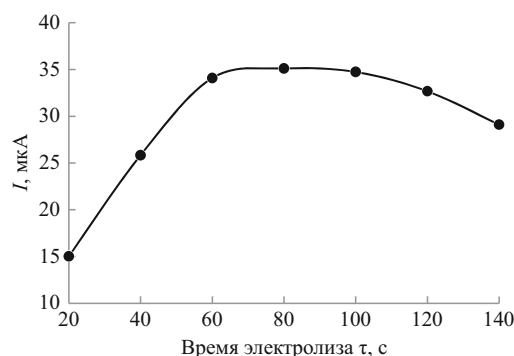


Рис. 5. Зависимость тока восстановления CoQ_{10} на стеклоуглеродном электроде от времени накопления в фосфатном буферном растворе (pH 6,86; концентрация CoQ_{10} — 1 мг/мл; скорость развертки потенциала — 100 мВ/с)

ления при $(-0,6 \pm 0,05)$ В, высота которого зависит от концентрации CoQ_{10} (рис. 6).

Для определения CoQ_{10} в растворе электрохимической ячейки используют метод добавок, внося в анализируемый раствор добавку с известной концентрацией CoQ_{10} и регистрируя вольтамперграммы пробы с добавкой.

Оценку показателей точности и внутрилабораторной прецизионности результатов определения CoQ_{10} по разработанной методике проводили путем анализа стандартных растворов согласно рекомендациям [21]. Правильность разработанной методики оценивали методом «введено — найдено» при анализе реальных объектов после их пробоподготовки (табл. 1).

Градуировочная зависимость описывается уравнением $I(\mu\text{A}) = 0,3454C(\text{mg/ml}) + 44,276$, $R^2 = 0,9935$, ее прямолинейный характер сохраняется в интервале концентраций от 10 до 100 мг/мл. Предел обнаружения, рассчитанный по $3S$ -критерию, составляет 0,01 мг/мл [22].

Используя разработанную вольтамперметрическую методику, определили CoQ_{10} в исследуемых БАД. В качестве референтного использовали метод дифференциальной спектрофотометрии для определе-

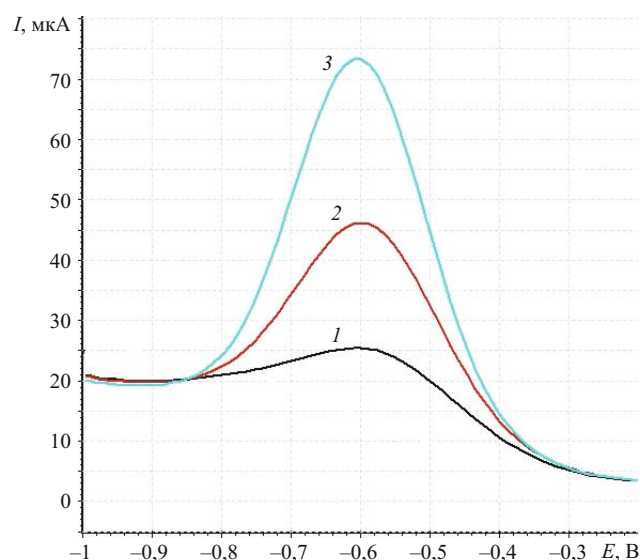


Рис. 6. Вольтамперограмма восстановления CoQ_{10} на СУЭ в фосфатном буферном растворе (рН 6,86) при разных значениях концентрации CoQ_{10} (мг/мл) в электрохимической ячейке: 1 — 1; 2 — 10; 3 — 40 ($E_0 = -1,2$ В; $\tau_s = 60$ с; скорость развертки потенциала — 100 мВ/с)

ния CoQ_{10} в фармацевтических препаратах и плазме крови [16], заключающийся в измерении оптической плотности раствора на характеристической длине волны спектра первого порядка 284 нм (ширина «окна» дифференцирования $\Delta\lambda = 14$ нм).

Для построения градуировочной зависимости готовили серию стандартных растворов CoQ_{10} различной концентрации (в качестве растворителя использовали *n*-гексан) и измеряли интенсивность поглощения раствора на длине волны 284 нм. Полученная градуировочная зависимость линейна в диапазоне концентраций от 0,25 до 10 мг/л. Для спектрофотометриче-

Таблица 1. Результаты проверки правильности методики определения CoQ_{10} ($P = 0,95$; $n = 2$; $l = 15$)

Введено CoQ_{10} , мг/мл	Найдено CoQ_{10} , мг/мл	Показатель внутри-лабораторной воспроизводимости (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости) δ_R , %	Показатель точности (границы, в которых находится погрешность результатов анализа) $\pm\delta$, %
0,02	0,0215	11	35
0,04	0,0404	11	35
0,06	0,0644	7	22
0,08	0,0811	7	22
0,1	0,0984	7	22

Таблица 2. Результаты определения CoQ_{10} (мг/мл) в БАД спектрофотометрическим и вольтамперометрическим методами ($n = 3$; $P = 0,95$)

Исследуемая БАД	Метод определения	
	ВА	СФ
«Кудесан» раствор	29 ± 2	28 ± 2
«Кудесан Форте» раствор	60 ± 4	58 ± 4

ского определения CoQ_{10} навеску исследуемого образца помещали в делительную воронку, затем добавляли 10 мл дистиллированной воды и 10 мл *n*-гексана. Смесь тщательно перемешивали, отстаивали и переносили органический слой в мерную колбу объемом 50 мл. Экстракцию повторяли дважды. Полученный экстракт переносили в мерную колбу объемом 50 мл и доводили объем раствора до метки *n*-гексаном. Все растворы готовили непосредственно перед анализом. Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра Agilent Technology Cary 60 UV-Vis. Результаты исследований приведены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, полученные результаты хорошо согласуются между собой, что является косвенным доказательством правильности разработанной вольтамперометрической методики.

Таким образом, выбраны условия определения CoQ_{10} в биологически активных добавках методом катодной вольтамперометрии на стеклоуглеродном электроде в водных нейтральных средах. Предложена простая и экспрессная методика определения CoQ_{10} , его предел обнаружения составил 0,01 мг/мл, диапазон определяемых концентраций — 10 – 100 мг/мл.

ЛИТЕРАТУРА

- Littaru G. P., Ho L., Folkers K. Deficiency of coenzyme Q_{10} in human heart disease. Part I and II / Int. J. Vit. Nutr. Res. 1972. Vol. 42. N 2, 3. P. 291, 413.
- Borekova M., Hojerova J., Koprda V., Bauerova K. Nourishing and health benefits of coenzyme Q_{10} — A review / Czech J. Food Sci. 2008. Vol. 26. N 4. P. 229 – 241.
- P 4.1.1672–03. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище.
- MP 2.3.1.1915–04. Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных добавок.
- Turkovic M., J., Karpinska J. Analytical Problems with determination of Coenzyme Q_{10} in Biological Samples / Biofactors. 2013. Vol. 39. N 2. P. 176 – 185.
- Tang P., Miles M. Measurement of reduced and oxidized coenzyme Q_9 and coenzyme Q_{10} levels in mouse tissue by HPLC with coulometric detection / Clin. Chim. Acta. 2004. Vol. 341. N 1 – 2. P. 173 – 184.
- Wang Q., Lee B. L., Ong C. N. Automated high-performance liquid chromatographic method with precolumn reduction for the determination of ubiquinol and ubiquinone in human plasma / J. Chromatogr. B. 1999. Vol. 726. P. 297 – 302.
- Duncan A., Heales S., Mills K. Determination of coenzyme Q_{10} status in blood mononuclear cells, skeletal muscle, and plasma by HPLC with di-propoxy-coenzyme Q_{10} as an internal standard / Clin. Chem. 2005. Vol. 51. N 12. P. 2380 – 2382.
- Galiniere A., Carriere A., Fernandez Y., et al. Biological validation of coenzyme Q redox state by HPLC-EC measurement: relationship between coenzyme Q redox state and coenzyme Q contents in rat tissue / FEBS Lett. 2004. Vol. 578. P. 53 – 57.
- Zu Y., Zhao C. A rapid and sensitive LC-MS/MS method for determination of coenzyme Q_{10} in tobacco (*Nicotina tabacum* L.) leaves / Clin. Chim. Acta. 2004. Vol. 341. P. 173 – 184.
- Teshima K., Kondo T. Analytical method for ubiquinone-9 and ubiquinone-10 in rat tissues by liquid chromatography/turbo ion spray tandem mass spectrometry with 1-alkylamine as an additive to mobile phase / Anal. Biochem. 2005. Vol. 338. P. 12 – 19.
- Hansen G., Christensen E., Tuchsén E. Sensitive and selective analysis of coenzyme Q_{10} in human serum by negative APCI LC-MS / Analyst. 2004. Vol. 129. N 1. P. 45 – 50.
- Jiang P., Wu M. Analysis of coenzyme Q_{10} in human plasma by column-switching liquid chromatography / J. Chromatogr. B. 2004. Vol. 805. N 2. P. 297 – 301.
- European pharmacopeia 5.0. Vol. 2. Council of Europe, Strasbourg, 2004.

15. **Laguna T. A., Sontag M. K., Osberg I., et al.** Decreased serum coenzyme Q₁₀ concentrations: a longitudinal study in children with cystic fibrosis / *J. Pediatr.* 2008. Vol. 153. P. 402 – 407.
16. **Karpinska J., Mularczyk B., Piotrowska-Jastrzebska J.** Application of derivative spectrophotometry for determination of coenzyme Q₁₀ in pharmaceuticals and plasma / *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998. Vol. 17. P. 1345 – 1350.
17. **Karpinska J., Frankowska R.** Application of tocopherol acetate as internal standard in UV-derivative spectrophotometric analysis of coenzyme Q₁₀ / *Instr. Sci. Technol.* 2004. Vol. 32. N 3. P. 281 – 290.
18. **Michalkiewicz S.** Voltammetric determination of coenzyme Q₁₀ in pharmaceutical dosage forms / *Bioelectrochem.* 2008. Vol. 73. P. 30 – 36.
19. **Haitham A. AL-Wahab, Sadallah T. Sulaiman, Itimad I. Taha.** Square Wave Voltammetry determination of coenzyme Q₁₀ / *Raf. J. Sci.* 2006. Vol. 17. N 4. P. 86 – 91.
20. **Litescu S.-C.** Voltammetric determination of coenzyme Q₁₀ at a solid glassy carbon electrode / *Instr. Sci. Technol.* 2001. Vol. 29. N 2. P. 109 – 116.
21. ГОСТ РМГ 61–2010. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. — М.: Стандартинформ, 2013. — 62 с.
22. **Экспериандова Л. П., Беликов К. Н., Химченко С. В., Бланк Т. А.** Еще раз о пределах обнаружения и определения / *Журн. аналит. химии.* 2010. Т. 65. № 3. С. 229 – 234.
8. **Duncan A., Heales S., Mills K.** Determination of coenzyme Q₁₀ status in blood mononuclear cells, skeletal muscle, and plasma by HPLC with di-propoxy-coenzyme Q₁₀ as an internal standard / *Clin. Chem.* 2005. Vol. 51. N 12. P. 2380 – 2382.
9. **Galinier A., Carriere A., Fernandez Y., et al.** Biological validation of coenzyme Q redox state by HPLC-EC measurement: relationship between coenzyme Q redox state and coenzyme Q contents in rat tissue / *FEBS Lett.* 2004. Vol. 578. P. 53 – 57.
10. **Zu Y., Zhao C.** A rapid and sensitive LC-MS/MS method for determination of coenzyme Q₁₀ in tobacco (*Nicotinia tabacum* L.) leaves / *Clin. Chim. Acta.* 2004. Vol. 341. P. 173 – 184.
11. **Teshima K., Kondo T.** Analytical method for ubiquinone-9 and ubiquinone-10 in rat tissues by liquid chromatography/turbo ion spray tandem mass spectrometry with 1-alkylamine as an additive to mobile phase / *Anal. Biochem.* 2005. Vol. 338. P. 12 – 19.
12. **Hansen G., Christensen E., Tuchsén E.** Sensitive and selective analysis of coenzyme Q₁₀ in human serum by negative APCI LC-MS / *Analyst.* 2004. Vol. 129. N 1. P. 45 – 50.
13. **Jiang P., Wu M.** Analysis of coenzyme Q₁₀ in human plasma by column-switching liquid chromatography / *J. Chromatogr. B.* 2004. Vol. 805. N 2. P. 297 – 301.
14. European pharmacopeia 5.0. Vol. 2. Council of Europe, Strasbourg, 2004.
15. **Laguna T. A., Sontag M. K., Osberg I., et al.** Decreased serum coenzyme Q₁₀ concentrations: a longitudinal study in children with cystic fibrosis / *J. Pediatr.* 2008. Vol. 153. P. 402 – 407.
16. **Karpinska J., Mularczyk B., Piotrowska-Jastrzebska J.** Application of derivative spectrophotometry for determination of coenzyme Q₁₀ in pharmaceuticals and plasma / *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998. Vol. 17. P. 1345 – 1350.
17. **Karpinska J., Frankowska R.** Application of tocopherol acetate as internal standard in UV-derivative spectrophotometric analysis of coenzyme Q₁₀ / *Instr. Sci. Technol.* 2004. Vol. 32. N 3. P. 281 – 290.
18. **Michalkiewicz S.** Voltammetric determination of coenzyme Q₁₀ in pharmaceutical dosage forms / *Bioelectrochem.* 2008. Vol. 73. P. 30 – 36.
19. **Haitham A. AL-Wahab, Sadallah T. Sulaiman, Itimad I. Taha.** Square Wave Voltammetry determination of coenzyme Q₁₀ / *Raf. J. Sci.* 2006. Vol. 17. N 4. P. 86 – 91.
20. **Litescu S.-C.** Voltammetric determination of coenzyme Q₁₀ at a solid glassy carbon electrode / *Instr. Sci. Technol.* 2001. Vol. 29. N 2. P. 109 – 116.
21. RF State Standard GOST RМГ 61–2010. Indicators of precision and accuracy methods of quantitative chemical analysis. Methods of evaluation. — Moscow: Standartinform, 2013. — 62 p. [in Russian].
22. **Éksperiandova L. P., Belikov K. N., Khimchenko S. V., Blank T. A.** Once again about determination and detection limits / *J. Anal. Chem.* 2010. Vol. 65. N 3. P. 223 – 228.

REFERENCES

1. **Littaru G. P., Ho L., Folkers K.** Deficiency of coenzyme Q₁₀ in human heart disease. Part I and II / *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 1972. Vol. 42. N 2, 3. P. 291, 413.
2. **Borekova M., Hojerova J., Koprda V., Bauerova K.** Nourishing and health benefits of coenzyme Q₁₀ — A review / *Czech J. Food Sci.* 2008. Vol. 26. N 4. P. 229 – 241.
3. R 4.1.1672–03. Manual methods of quality control and safety of biologically active additives to food [in Russian].
4. MR 2.3.1.1915–04. Recommended levels of food consumption and dietary supplements [in Russian].
5. **Turkowiec M., J., Karpinska J.** Analytical Problems with determination of Coenzyme Q₁₀ in Biological Samples / *Biofactors.* 2013. Vol. 39. N 2. P. 176 – 185.
6. **Tang P., Miles M.** Measurement of reduced and oxidized coenzyme Q₉ and coenzyme Q₁₀ levels in mouse tissue by HPLC with coulometric detection / *Clin. Chim. Acta.* 2004. Vol. 341. N 1 – 2. P. 173 – 184.
7. **Wang Q., Lee B. L., Ong C. N.** Automated high-performance liquid chromatographic method with precolumn reduction for the determination of ubiquinol and ubiquinone in human plasma / *J. Chromatogr. B.* 1999. Vol. 726. P. 297 – 302.