

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Ksenja DAVID

**UVAJANJE IN OPTIMIZACIJA METODE ZA DOLOČANJE CoQ<sub>10</sub> V  
MLEKU IN MLEČNIH IZDELKIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**INTRODUCTION AND OPTIMIZATION OF METHOD FOR  
DETERMINATION OF CoQ<sub>10</sub> IN MILK AND DAIRY PRODUCTS**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Praktični del je bil opravljen v laboratoriju za prehrabeno kemijo Kemijskega inštituta v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela določila prof. dr. Ireno Rogelj, za somentorico dr. Alenko Golc Wondra in za recenzentko prof. dr. Veroniko Abram.

Mentorica: prof. dr. Irena Rogelj

Somentorica: dr. Alenka Golc Wondra

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ksenja David

### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 543.544:577.15:637.12/.14(043)=863  
KG analize metode/ekstrakcija tekoče-tekoče/LLE/ekstrakcija na trdni fazi/SPE/HPLC/validacija metode/koencim Q<sub>10</sub>/mleko/mlečni izdelki  
AV DAVID, Ksenja  
SA ROGELJ, Irena (mentorica)/GOLC WONDRÁ, Alenka (somentorica)/ABRAM, Veronika (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2007  
IN UVAJANJE IN OPTIMIZACIJA METODE ZA DOLOČANJE CoQ<sub>10</sub> V MLEKU IN MLEČNIH IZDELKIH  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP IX, 61 str., 27 pregl., 12 sl., 26 vir.  
IJ Sl  
JI sl/en  
AI Koencim Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) je močan antioksidant in varuje telo pred prostimi radikali. Ker se vsebnost koencima Q<sub>10</sub> po 30. letu v človeškem telesu začne zmanjševati, je ideja o dodatku tega antioksidanta živilom seveda zelo smiselna. Mleko in mlečni izdelki so primerna živila za dodajanje CoQ<sub>10</sub>, saj ga v majhnih količinah že sami vsebujejo. Ker morajo biti vnosi funkcionalnih učinkovin natančno dozirani, smo želeli v diplomskem delu razviti optimalen postopek za določanje vsebnosti CoQ<sub>10</sub> v mleku in mlečnih izdelkih. Optimizirali smo ga z izbiro ustrežnejšega postopka ekstrakcije CoQ<sub>10</sub> iz mleka in mlečnih izdelkov ter z določitvijo optimalnih pogojev delovanja HPLC sistema. Primernost izbrane metode smo potrdili z validacijo. Pričakovali smo, da bo ekstrakcija CoQ<sub>10</sub> iz mleka in mlečnih izdelkov ob uporabi ekstrakcije na trdni fazi (SPE) učinkovitejša, vendar nismo dosegli zadovoljivih rezultatov. Izkoristki ekstrakcije so bili znatno nižji, kot pri ekstrakciji tekoče – tekoče (LLE), kjer smo dosegli zadovoljive rezultate, zato je bila ekstrakcija v tekočo fazo v našem primeru bolj ustrezna. Z optimalnimi pogoji ločbe HPLC sistema smo dosegli, da na mestu odziva koencima Q<sub>10</sub> v uporabljenih reagentih, topilu in mobilni fazi ni bilo odzivov, ki bi motili določanje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub>. Večji odziv koencima Q<sub>10</sub> smo zaznali pri mleku z več maščobe, kar smo glede na dobro topnost Q<sub>10</sub> v maščobah, tudi pričakovali. Glede na rezultate validacije metoda izpolnjuje vse pogoje za določanje koencima Q<sub>10</sub> v mleku in mlečnih izdelkih.

### KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn  
DC UDC 543.544:577.15:637.12/.14(043)=863  
CX analytical methods/liquid–liquid extraction /LLE/solid phase  
extraction/SPE/HPLC/ method validation /coenzyme Q<sub>10</sub>/milk/dairy products  
AU DAVID, Ksenja  
AA ROGELJ, Irena (supervisor)/GOLC WONDRÁ, Alenka (co-advisor)/ABRAM,  
Veronika (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and  
Technology  
PY 2007  
TI INTRODUCTION AND OPTIMIZATION OF METHOD FOR  
DETERMINATION OF CoQ<sub>10</sub> IN MILK AND DAIRY PRODUCTS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO IX, 61 p., 27 tab., 12 fig., 26 ref.  
LA SI  
AL sl/en  
AB Coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) is a strong antioxidant which protects human body from  
free radicals. Because the concentration of coenzyme Q<sub>10</sub> is decreasing after 30  
years in human body, scientists came to an idea that supplementation of food with  
CoQ<sub>10</sub> can increase daily consumption of CoQ<sub>10</sub>. As CoQ<sub>10</sub> is naturally present in  
small quantities in milk and dairy products they are convenient food for its  
supplementation. The addition of functional component must be precisely dosed  
therefore we tried to develop an optimal procedure for determination of CoQ<sub>10</sub> in  
milk and dairy products. We optimized the procedure by choosing a better  
procedure for extraction of CoQ<sub>10</sub> from milk and dairy products, and by designation  
of optimal working conditions for HPLC system. Validation of introduced method  
confirmed its adequacy. We expected that the extraction of CoQ<sub>10</sub> will be more  
efficient by using solid phase extraction (SPE), nevertheless we did not achieve  
satisfied results. The extraction efficacy of SPE method was much lower compared  
to liquid – liquid extraction (LLE), where we achieved satisfied results. Extraction  
in liquid phase gave in our case better results. When optimal separation conditions  
of HPLC system were achieved no responses on the place of CoQ<sub>10</sub> response were  
observed with reagents, solvent and mobile phase used in the analytical procedure  
which could interfere with determination of CoQ<sub>10</sub>. We perceived a better response  
of CoQ<sub>10</sub> in milk with more fat, what we expected with regard to solubility of  
CoQ<sub>10</sub> in fat. The results of validation confirmed the suitability of the method for  
determination of coenzyme Q<sub>10</sub> in milk and dairy products.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AS	Automatic sampler (avtomatski podajalec)
ATP	Adenozintrifosfat
CoQ <sub>10</sub>	Koencim Q <sub>10</sub> , ubikinon
DL	Detection limit (meja detekcije)
DNK	Deoksiribonukleinska kislina
FMN	Flavin-mononukleotid
GLP	Good laboratory practice (dobra laboratorijska praksa)
HPLC	High performance liquid chromatography (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti)
K	Porazdelitveni koeficient
k'	Faktor kapacitivnosti
LLE	Liquid – liquid extraction (ekstrakcija tekoče – tekoče)
m.m.	Mlečne maščobe
N	Število teoretskih podov
NADH	Reducirani nikotinamidadeninukleotid
Ow	Organic waste (organski odpadek)
RS	Raztopina standarda
RSD	Relativni standardni odklon
SD	Standard deviation (standardni odklon)
SPE	Solid phase extraction (ekstrakcija na trdni fazi)
SST	System suitability test (test ustreznosti sistema)
T	Faktor popačenja
TLC	Thin layer chromatography (tenkoplastna kromatografija)
t <sub>r</sub>	Retencijski čas
v/v	Volumski delež
QL	Quantization limit (meja kvantizacije)

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJI NALOGE.....	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 MLEKO IN MLEČNI IZDELKI .....	3
2.2 UBIKINON .....	4
2.2.1 Lastnosti ubikinona .....	5
2.2.2 Radikali.....	6
2.2.3 Antioksidanti .....	7
2.2.4 Delovanje ubikinona.....	8
2.2.5 Ubikinon v telesu.....	9
2.2.6 Pozitiven učinek ubikinona pri posameznih boleznih .....	9
2.2.7 Eksogeni CoQ <sub>10</sub> .....	10
2.2.8 Ubikinon v hrani.....	11
2.3 EKSTRAKCIJA .....	13
2.3.1 SPE in LLE.....	13
2.4 METODE DOLOČANJA.....	16
2.4.1 Kromatografska metoda visoke ločljivosti (HPLC) .....	16
2.5 VALIDACIJA .....	19
<b>3 EKSPERIMENTALNO DELO.....</b>	<b>22</b>
3.1 MATERIALI .....	22
3.1.1 Koencim Q <sub>10</sub> (CoQ <sub>10</sub> ) – standard .....	22

3.1.2	Vzorci .....	22
3.2	METODE DELA .....	23
3.2.1	Določanje koencima Q <sub>10</sub> .....	23
3.2.2	Ekstrakcija koencima Q <sub>10</sub> .....	24
3.2.3	Validacija analiznega postopka (HPLC) določanja vsebnosti CoQ <sub>10</sub> .....	26
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>29</b>
4.1	EKSTRAKCIJA .....	29
4.1.1	LLE.....	30
4.1.2	SPE .....	31
4.2	VALIDACIJA .....	33
4.2.1	Ustreznost kromatografskega sistema (SST – system suitability test).....	33
4.2.2	Natančnost metode .....	34
4.2.3	Točnost metode .....	35
4.2.4	Točnost metode – Mlečni izdelki .....	39
4.2.5	Potrditev točke QL .....	42
4.2.6	Selektivnost metode.....	44
4.2.7	Robustnost metode .....	48
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>52</b>
5.1	RAZPRAVA.....	52
5.1.1	Vsebnost CoQ <sub>10</sub> v mleku in mlečnih izdelkih .....	52
5.1.2	Validacija metode .....	54
5.2	SKLEPI.....	56
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>59</b>

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1 - Pregled bolezni, pri katerih se CoQ <sub>10</sub> lahko uporablja kot dopolnilo k zdravljenju (Stocker, 2002) .....	10
Preglednica 2 - Vsebnost ubikinona v hrani (Mattila in Kumpulainen, 2001). .....	12
Preglednica 3 - Hierarhija analiznih opravil (Prošek, 1996). .....	19
Preglednica 4 - Postopek za SPE.....	26
Preglednica 5 - Povprečna vsebnost CoQ <sub>10</sub> (µg/ml) v mleku s 3,5 % maščobe .....	29
Preglednica 6 - Povprečna vsebnost CoQ <sub>10</sub> (µg/ml) v mleku z 1,6 % maščobe .....	29
Preglednica 7 - Povprečna vsebnost CoQ <sub>10</sub> (µg/ml) v mleku z 0,5 % maščobe .....	30
Preglednica 8 - Izkoristek ekstrakcije koencima Q <sub>10</sub> iz mleka s 3,5 % maščobe, s standardnim dodatkom Q <sub>10</sub> , po metodi LLE.....	30
Preglednica 9 - Izkoristek ekstrakcije koencima Q <sub>10</sub> iz mleka s 3,5 % maščobe, s standardnim dodatkom Q <sub>10</sub> , po metodi SPE.....	31
Preglednica 10 - Parametri SST tekom validacije metode .....	33
Preglednica 11 - Povprečna vsebnost CoQ <sub>10</sub> v mleku s 3,5 % maščobe .....	34
Preglednica 12 - Točnost metode pri mleku s 3,5 % maščobe .....	35
Preglednica 13 - Točnost metode pri mleku z 1,6% maščobe .....	36
Preglednica 14 - Točnost metode pri mleku z 0,5 % maščobe .....	37
Preglednica 15 - Povprečna vsebnost CoQ <sub>10</sub> (µg/ml) v kefirju s 3,5 % maščobe.....	39
Preglednica 16 - Povprečna vsebnost CoQ <sub>10</sub> (µg/ml) v kislem mleku.....	39
Preglednica 17 - Povprečna vsebnost CoQ <sub>10</sub> (µg/ml) v jogurtu z 1,5 % maščobe.....	39
Preglednica 18 - Povprečna vsebnost CoQ <sub>10</sub> (µg/ml) v jogurtu z 1,3 % maščobe.....	40
Preglednica 19 - Točnost metode pri kefirju .....	40
Preglednica 20 - Točnost metode pri kislem mleku in jogurtih LCA.....	41
Preglednica 21 - Potrditev točke QL pri mleku s 3,5 % maščobe .....	42
Preglednica 22 - Potrditev točke QL pri mleku z 1,6 % maščobe .....	42
Preglednica 23 - Potrditev točke QL pri mleku z 0,5% mlečne maščobe.....	43
Preglednica 24 - Potrditev točke QL pri kefirju .....	43
Preglednica 25 - Stabilnost standardnih raztopin, hranjenih v hladilniku pri temperaturi 2–8 °C v temi, po času t = 0 h in t = 48 h.....	49
Preglednica 26 - Stabilnost standardnih raztopin, hranjenih pri sobni temperaturi, po času t = 0 h in t = 48 h .....	50
Preglednica 27 – Povzetek preiskovanih parametrov validacije, njihovi kriteriji in dobljeni rezultati .....	51



## KAZALO SLIK

Slika 1 - Formula ubikinona (Boyer, 2002).....	4
Slika 2 – Proces oksidativne fosforilacije (Boyer, 2005) .....	5
Slika 3 - HPLC kromatogram vzorca mleka s 3,5 % maščobe z dodanim koencimom Q <sub>10</sub> po LLE ekstrakciji .....	31
Slika 4 - HPLC kromatogram vzorca mleka s 3,5 % maščobe, z dodanim koencimom Q <sub>10</sub> po SPE ekstrakciji .....	32
Slika 5 - HPLC kromatogram topila 1: 2 - propanol .....	44
Slika 6 - HPLC kromatogram topila 2: 1,4 - dioksan .....	45
Slika 7 - HPLC kromatogram mobilne faze .....	45
Slika 8- HPLC kromatogram raztopine standarda koencima Q <sub>10</sub> .....	46
Slika 9 - HPLC kromatogram vzorca mleka s 3,5 % maščobe.....	46
Slika 10 - HPLC kromatogram vzorca mleka s 3,5 % maščobe z dodanim koencimom Q <sub>10</sub> .....	47
Slika 11 - HPLC kromatogram vzorca mleka z 1,6 % maščobe.....	47
Slika 12 - HPLC kromatogram vzorca mleka z 0,5 % maščobe.....	48

## 1 UVOD

Ljudje si v želji po daljšem življenju vse bolj prizadevajo upočasniti procese staranja. Dejstvo je, da v resnici obstaja, oziroma je odkritih, vedno več snovi, ki upočasnjujejo staranje in varujejo pred boleznimi, ki jih sam proces staranja ter številni ostali dejavniki prinašajo. Večina teh snovi ima skupno lastnost, in sicer antioksidativno sposobnost. Med številnimi, do sedaj odkritimi antioksidanti, v zadnjih letih vedno bolj pridobiva na pomenu koencim Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) oziroma ubikinon 10.

CoQ<sub>10</sub> je v maščobi topen, endogeno prisoten benzokinon, ki ga najdemo v številnih aerobnih organizmih. Nahaja se v notranjih membranah mitohondrijev, kjer nastaja celična energija, v večjih koncentracijah pa ga najdemo v celicah srca in jeter. Ravno zaradi dejstva, da je v telesu prisoten povsod, je njegovo drugo ime ubikinon, kar pomeni povsod prisotni kinon.

Kemijsko ime za ubikinon je 2,3-dimetoksi-5-metil-6-dekaprenilbenzokinon. Nahaja se v dveh redoks oblikah, različnih dolžin izoprenilne stranske verige (6-10 enot). Dominantna oblika CoQ pri človeku in večini živali je Q<sub>10</sub>. Ubikinon, kot sestavni del celičnega dihanja, sodeluje pri oksidativni fosforilaciji - nastajanju molekul adenzintrifosfata (ATP).

Ker je v majhnih količinah ubikinon naravno prisoten tudi v mleku, so raziskovalci pomislili, da bi bili mleko in mlečni izdelki lahko dobra živila za vnos koencima Q<sub>10</sub>. Tako bi lahko s hrano vnašali ubikinon v organizem in na ta način povečali njegovo prisotnost.

### 1.1 CILJI NALOGE

Cilj naloge je bil vpeljati metodo za določanje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v mleku in mlečnih izdelkih. Poudarek je bil na iskanju načinov in optimalnih pogojev ekstrakcije (čas, topila) CoQ<sub>10</sub> iz mleka in mlečnih izdelkov. Končno vrednotenje načina ekstrakcije je bilo izvedeno z metodo HPLC in njeno validacijo.

## 1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Pričakovali smo, da bo ekstrakcija CoQ<sub>10</sub> iz mleka in mlečnih izdelkov z uporabo ekstrakcije na trdni fazi (SPE) učinkovitejša, oziroma nam bo dala boljši izkoristek in bo tudi časovno primernejša kot ekstrakcija tekoče-tekoče (LLE).

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 MLEKO IN MLEČNI IZDELKI

Mleko je čist, nespremenjen, svež proizvod mlečne žleze v času laktacije, dobljen s popolno in redno molžo zdravih, pravilno krmljenih in oskrbovanih krav, ovc ali koz, ki mu ni nič dodano ali odvzeto (Pravilnik o kakovosti mleka..., 1993). Glede na vrsto molžene živali je mleko lahko kravje (v nadaljevanju: mleko), ovčje, kozje, kobilje, bivolje itd. Izraz mleko uporabljamo samo za kravje mleko, vse ostale vrste mleka pa je potrebno posebej opredeliti (npr. kozje mleko, ovčje mleko itd.) (Mavrin in Oštir, 2002).

Mleko je po prehranski vrednosti najpopolnejše živilo, saj vsebuje vse hranilne snovi v pravilnem razmerju in ustrezni količini. Biološko je visokovredno in je človekova prva hrana, ki ga nato spremlja vse življenje. Prvi izloček mlečne žleze ali kolostrum je še posebej pomemben za novorojenčka, ker vsebuje tudi naravne zaščitne snovi. Kasneje lahko materino mleko nadomesti kravje. Sveže kravje mleko ima naslednjo povprečno kemično sestavo: 87,5 % vode, 3,8 % mlečne maščobe, 3,3 % beljakovin, 4,7 % mlečnega sladkorja, 0,7 % rudninskih snovi ter druge snovi (Mavrin in Oštir., 2002).

Med hranilnimi snovmi so najpomembnejše beljakovine. Mleko je bogat vir kalcija in fosforja. Vsebuje tudi vitamine (A, B1, B2, D, niacin in C), encime, organske kisline in druge snovi, ki mu dajejo bogato biološko vrednost in dobro prebavljivost. Energijska vrednost enega litra mleka znaša približno 690 kcal ali 2948 kJ (Mavrin in Oštir, 2002).

Mleko je hitro pokvarljivo živilo. Obstočnost mu podaljšamo z različnimi tehnološkimi postopki. Z obdelavo mu tako spremenimo lastnosti in dobimo različne proizvode, ki jih imenujemo mlečni izdelki, kot so pasterizirano mleko, sterilizirano mleko, fermentirano mleko, smetana, mlečne pijače, siri, surovo maslo in mlečni sladoledi.

Fermentirane vrste mleka so tisti mlečni izdelki, ki jih dobimo s fermentacijo toplotno obdelanega mleka (polnega, delno posnetega, posnetega), ki je ali ni homogenizirano. Fermentacijo omogoči ustrezna količina mikrobiološkega cepiva, v katerem so predvsem mlečnokislinske bakterije, izjemoma tudi kvasovke. Najbolj značilne vrste fermentiranega

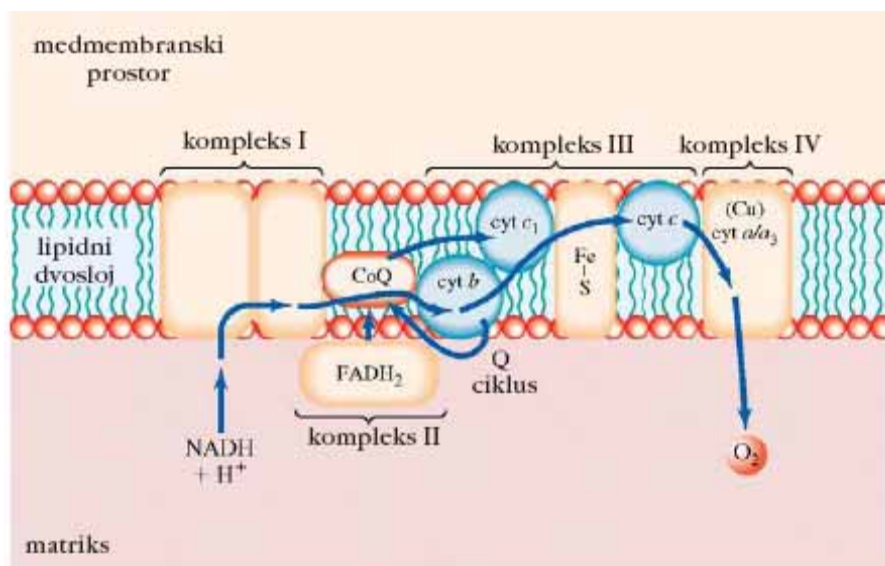


### 2.2.1 Lastnosti ubikinona

Ubikinon je močen antioksidant in varuje telo pred prostimi radikali. Ker je koencim Q<sub>10</sub> relativno termostabilen, fotostabilen in ni citotoksičen, dobiva kot zdravilo in kot dopnilo k prehrani obetavno mesto pri preprečevanju in zdravljenju bolezni pri človeku (Pavlin, 1997).

Vsebnost ubikinona v hrani se zmanjša s shranjevanjem, kuhanjem, pečenjem ali konzerviranjem, zato se priporoča uživanje sveže hrane ali prehrabnih dodatkov v farmacevtskih oblikah (kapsule, tablete...). Ubikinon ima veliko molsko maso (863 g/mol) in je netopen v vodi (Ernster in Dallner, 1995).

Ubikinon skrbi za nastanek 95 % celotne telesne energije in brez njega ni življenja. Brez ubikinona nobena celica ne more funkcionirati. Mitohondriji so kot tovarne celice, ki proizvajajo adozintrifosfat (ATP), ki oskrbuje z energijo mnogo celičnih funkcij. ATP je kot gorivo za vsako celico in je vitalnega pomena za življenje celic. Ubikinon je ključna komponenta v verigi reakcij nastanka ATP – to je v procesu, ki se imenuje oksidativna fosforilacija (Ernster in Dallner, 1995).



Slika 2 – Prenos elektronov (Boyer, 2005)

Legenda (Boyer, 2005):

- Kompleks I: NADH: ubikinon-oksido-reduktaza: Proteini v kompleksu I imajo flavinske (FMN) ali železo-žveplove (FeS) prostetične skupine. Elektroni vstopajo v kompleks iz NADH in potujejo proti CoQ.
- Kompleks II: Vstop elektronov iz FADH<sub>2</sub> v verigo za prenos elektronov (kompleks I in kompleks II). Elektroni iz sukcinata in maščobnih kislin se prek posebnih od FAD odvisnih dehidrogenaz prenesejo na CoQ.
- Kompleks III: Kompleks III prenaša elektrone iz CoQH<sub>2</sub> na citokrom c (cit c). V tem kompleksu so prenašalci elektronov FeS in citokromi.
- Kompleks IV: citokrom c-oksidaza: Kompleks sestavlja deset proteinskih podenot z dvema vrstama prostetičnih skupin: hem (a in a<sub>3</sub>) in dva bakrova iona (Cu). Elektroni, ki se prenašajo od citokroma c do O<sub>2</sub>, potujejo prek Fe ionov v obeh hemih in preko Cu ionov.

Ubikinon je koencim za vsaj tri mitohondrijske encime – povezuje multiencimske komplekse tipa oksido-reduktaz, ki omogočajo transport elektronov v dihalni verigi in je tako pomemben člen pri sintezi molekul ATP (Ernster in Dallner, 1995).

### 2.2.2 Radikali

Radikali ali kot jih pogosteje imenujemo, prosti radikali, so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim nevezanim elektronom. So zelo reaktivni, zato kot prosti radikali obstajajo le zelo kratek čas. Poškodujejo celične strukture, vključno z nukleinskimi kislinami in geni. Nastajajo pri cepitvi kovalentne vezi. So rezultat normalne celične presnove (dihanja) in posledica dejavnikov okolja: UV in gama žarkov, toplote, kajenja, pitja alkohola, onesnaženega okolja, itd. Tudi nekatere snovi in zdravila (aflatoksini, alkohol, analgetiki, anestetiki, citostatiki itd.) povzročajo nastajanje prostih radikalov (Korošec, 2000).

Kisikovi prosti radikali so udeleženi pri številnih normalnih in patoloških procesih v telesu. Prosti radikali imajo pomembno vlogo pri staranju, degenerativnih boleznih, raku, ishemiji, kardiovaskularnih boleznih, aterosklerozi, zmanjšani imunski odpornosti, Alzheimerjevi, Parkinsonovi in Chronovi bolezni, sladkorni bolezni, bolezni jeter in ledvic, pri fizičnih obremenitvah (še posebej pri športnikih – intenzivnih treningih) in pri prehrani, v kateri

primanjkuje naravnih antioksidantov (vitamini A, C in E,  $\beta$ -karoteni, flavonoidi), aminokislin (cisteina, cistina, glutationina) ter elementov v sledovih (selen, cink, mangan, baker) (Korošec, 2000).

Vir prostih radikalov v celicah je celično dihanje, ki poteka v mitohondrijih, flavoproteini, lipoksigenaze, hemoglobin, ciklooksigenaze, ksantin-oksidaža, peroksisomi, citokromi, sevanja, kajenje, itn. (Korošec, 2000).

Za preprečevanje in popravo oksidativnih poškodb celic je pomemben antioksidativni sistem. Če poznamo antioksidativni status organizma, lahko zagotovimo primeren vnos antioksidantov (Korošec, 2000).

### **2.2.3 Antioksidanti**

Antioksidanti so snovi, ki varujejo vsako posamezno celico v človeškem organizmu pred oksidacijo (prostimi radikali). Antioksidant je substanca, ki prepreči ali upočasni oksidacijo substrata (Korošec, 2000).

Porušeno ravnotežje med prostimi radikali in antioksidanti imenujemo oksidativni stres. Antioksidanti ga preprečujejo ali z lovljenjem prostih radikalov, ali s keliranjem kovinskih ionov, ali z odstranjevanjem in/ali popravljenjem oksidativno poškodovanih biomolekul (Korošec, 2000).

Antioksidanti, ki varujejo telo pred učinki prostih radikalov so encimi (hiperoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza...), vitamini (A, E, C), betakaroteni, katehini, itn. ter mikrorudnine – selen, cink, baker, mangan. Nekatere antioksidante sintetizira telo samo (glutation, sečno kislino, ubikinon), druge pa dobimo s hrano, tako kot vitamine ali kovine v sledovih (Korošec, 2000).

Po topnosti delimo antioksidante na vodotopne antioksidante (v to skupino spadajo L-askorbinska kislina, glutation in flavonoidi) in pa na lipofilne antioksidante – to so antioksidanti topni v maščobah (kot so ubikinon, vitamin E, karotenoidi, retinoidi) (Korošec, 2000).



Z ozirom na način delovanja, antioksidante razvrščamo v tri skupine (Korošec, 2000):

- antioksidanti, ki vežejo proste radikale,
- reducenti, ki reducirajo oksidante,
- sinergisti, ki povečujejo delovanje antioksidantov (boljši učinek dosežemo z uživanjem več antioksidantov kot z uživanjem samo enega).

V normalnih razmerah so oksidanti v celici v stalnem ravnotežju z antioksidanti. Pomanjkanje antioksidantov (oksidativni stres) privede do različnih bolezni. Uravnotežena prehrana vsebuje dovolj antioksidantov, vendar pa je potrebna tudi normalna absorpcija antioksidantov iz prebavil. Antioksidanti zmanjšajo čas obnavljanja mišičnega tkiva, kar je posebej pomembno po večjih fizičnih naporih. Visoki odmerki antioksidantov pa so lahko tudi nevarni. Še posebej so nevarni lipofilni antioksidanti, ki se ne izločijo z urinom, tako kot vodotopni antioksidanti, temveč se kopičijo v telesu (Korošec, 2000).

O antioksidativnih lastnostih in uporabi koencima Q<sub>10</sub> na področju živilstva je malo znanega (Bracco in sod., 1989). Ker Q<sub>10</sub> nima aktivnega vodikovega atoma, ne preseneča, da ta spojina ne kaže takega antioksidativnega delovanja kot, npr. fenolne spojine ali amini, ki so tipični primarni antioksidanti živil. Raziskave so pokazale, da je Q<sub>10</sub> potencialni antioksidant le v prisotnosti substance, ki jo lahko reducira, npr. vitamina C (dispergirana v lipidni fazi s pomočjo emulgatorja, npr. lecitina) (Rudan Tasič, 2000).

#### **2.2.4 Delovanje ubikinona**

Ubikinon, kot sestavni del celičnega dihanja, sodeluje pri nastajanju molekul ATP – temeljnih energetsko bogatih spojin življenja. Leta 1966 so ugotovili, da se ubikinon nahaja v dveh oblikah. Reducirana oblika, ubinol, je zelo učinkovit antioksidant. Kot lovilec prostih radikalov ima ubikinon celo večji redukcijski potencial kot vitamina C in E. Preprečuje namreč peroksidacijo maščob, in sicer takoj v začetku procesa, kar je drugače od vitamina E, ki učinkuje predvsem tako, da prekine verižno reakcijo in tako zavira širjenje škodljivega procesa (Mitchell, 1991).

Ubikinon pomaga stabilizirati celične membrane, kar bistveno pripomore k temu, da ostanejo celice nedotaknjene in so sposobne funkcionirati. Poškodbe, ki jih povzročijo

prosti radikali, zmanjšajo oskrbovanje celic z energijo celo za 80 %. Ubikinon kot antioksidant preprečuje te poškodbe in posledično tudi pomanjkanje energije v organizmu (Mitchell, 1991).

### **2.2.5 Ubikinon v telesu**

Največ ga je v srcu, ledvicah, možganih in pljučih. Dobimo ga z mesom, z ribami, sojo in špinačo. V celicah ga je 40-50 % v mitohondrijih, 25–30 % v jedru, 15–20 % v endoplazmatskem retikulumu in 5–10 % v citosolu (Korošec, 2000).

### **2.2.6 Pozitiven učinek ubikinona pri posameznih boleznih**

Človek je sposoben, ob pravilni prehrani, sintetizirati dovolj CoQ<sub>10</sub>, vendar kmalu po tridesetem letu začne endogena raven CoQ<sub>10</sub> upadati, zato moramo pomanjkanje ubikinona nadomestiti z eksogenim vnosom. Zaradi pomanjkanja ubikinona se začno pojavljati razne bolezni, ki jih lahko pozdravimo ali preprečimo njihov nadaljni razvoj. Ubikinon se uspešno uporablja pri zdravljenju raznih srčnih obolenj, kot so srčno popuščanje (kardiomiopatija), aritmija, visok krvni tlak, infarkt, angina pectoris ter pri boleznih, ki so odraz uživanja raznih zdravil (Stocker, 2002).

Pri angini pectoris se z dnevnim vnosom 159 mg CoQ<sub>10</sub> poveča možnost fizičnih naporov brez pojava bolečin v prsih. Zdi se, da CoQ<sub>10</sub> povečuje toleranco srca pri pomanjkanju kisika in znižuje krvni tlak z zmanjševanjem upora pri pretoku krvi. Vpliv CoQ<sub>10</sub> na mitohondrije izboljšuje stanje pri ljudeh z Alzheimerjevo boleznijo. CoQ<sub>10</sub> vpliva tudi na imunski sistem organizma (Stocker, 2002).

Opisanih je nekaj primerov raka na pljučih, kjer se je pojavila regresija tumorjev po uporabi velikih količin ubikinona. Ker je CoQ<sub>10</sub> povezan s pretvorbo energije, lahko z dodatkom vplivamo na porabo ogljikovih hidratov v organizmu. Preliminarni rezultati kažejo, da dodatki pri bolnikih z diabetesom, znižujejo raven krvnega sladkorja. Trenutno potekajo raziskave, ki potrjujejo, da dodatek CoQ<sub>10</sub> povečuje fizično kondicijo in preprečuje paradontozo. Vse številnejše raziskave in klinični preizkusi kažejo pozitivne učinke koencima pri različnih boleznih (Stocker, 2002).

Za zdravljenje kardiovaskularnih boleznih so CoQ<sub>10</sub> prvič uporabili leta 1965. Leta 1972 pa so predstavili praktičnost uporabe CoQ<sub>10</sub> pri zdravljenju srčnega napada (Littarru in Tiano, 2005).

**Preglednica 1** - Pregled bolezni, pri katerih se CoQ<sub>10</sub> lahko uporablja kot dopolnilo k zdravljenju (Stocker, 2002)

<b>BOLEZNI</b>	<b>DOKAZI</b>
angina pectoris visok krvni tlak	številni in verodostojni raziskovalni podatki kažejo na močno izboljšanje zdravstvenega stanja
kardiomiopatija diabetes periodentalne bolezni srčni napad odpoved ledvic	preliminarne študije kažejo izboljšanje ali vsaj delno izboljšanje zdravstvenega stanja
Alzheimerjeva bolezen povečanje atletske zmožnosti rak na prsih aids neplodnost pri ženskah pljučni rak mišična distrofija rak prostate	trditve nimajo zadostne znanstvene podpore in izboljšanja niso velika

### 2.2.7 Eksogeni CoQ<sub>10</sub>

Industrijska proizvodnja koencima Q<sub>10</sub> se je začela leta 1974, ko je japonska družba Nisshin uspela ekstrahirati koencim iz tobaka. Sledila so ji številna druga podjetja in kmalu se je proizvodnja koencima Q<sub>10</sub> razširila po vsej Japonski. Praktično ves CoQ<sub>10</sub>, ki ga danes uporabljamo, je narejen na Japonskem. Prodaja se v obliki tablet, s prahom napoljenih kapsul ali želatinastih kapsul, kjer je CoQ<sub>10</sub> raztopljen v olju (Ernster in Dallner, 1995).

CoQ<sub>10</sub> se topi v maščobah in njegova absorpcija v telesu se bistveno poveča, če ga zaužijemo s hrano, ki vsebuje maščobe. Komercialno dostopne kapsule CoQ<sub>10</sub> vsebujejo oljno disperzijo (soft gels) ali suh prah (hard gels) (Ernster in Dallner, 1995).

Številni, ne pa vsi, raziskovalci se strinjajo, da se v maščobi raztopljen CoQ<sub>10</sub> absorbira hitreje, kot pa uprašen. Izvedene so bile številne študije, s katerimi so ugotavljali bioekvivalenčnost želatinastih, trdnih kapsul in tablet. S študijami pridobljeni podatki kažejo, da so boljše topni preparati tudi sprožili večjo vsebnost CoQ<sub>10</sub> v krvi (Ernster in Dallner, 1995).

### **2.2.8 Ubikinon v hrani**

V majhnih količinah je ubikinon prisoten v različni hrani, posebno veliko ga je v mišicah organov kot so srce, jetra in ledvica. Ubikinon lahko najdemo v mesu, zelenjavi, žitnih jedeh, jajcih, soji, ribah, lešnikih, arašidih in mlečnih izdelkih (Mattila in Kumpulainen, 2001).

Raziskovalci na Danskem so ugotovili, da je povprečna količina ubikinona v danskem jedilniku 3-5 mg na dan. Hkrati so v tej raziskavi ugotavljali tudi, koliko ubikinona vsebujejo posamezna živila, pripravljena na različne načine (Mattila in Kumpulainen, 2001). Izsledki raziskave so prikazani v preglednici 2.

**Preglednica 2** - Vsebnost ubikinona v hrani (Mattila in Kumpulainen, 2001).

tip hrane	način priprave	število vzorcev	vsebnost ubikinona (µg/g hrane)
srčna mišica prašiča	cvrenje	9	203 (151-282)
kokoš	cvrenje	1	17
govedina	cvrenje	1	31
šunka	kuhanje	3	7,7 (5,4-9,4)
losos	dimljenje	1	4,3
slaniki	mariniranje	1	27
kruh (ržen)	/	1	0,17
kruh (pšenični)	/	1	0,09
riž	kuhanje	1	0,18
brokoli	kuhanje	3	6,6 (5,9-7,7)
cvetača	kuhanje	1	4,9
paradižnik	/	1	0,19
krompir	kuhanje	1	0,52
korenje	kuhanje	1	0,21
korenje	/	1	0,24
kumare	/	1	0,08
pomaranče	/	1	2,2
jabolka	/	1	1,1
kivi	/	1	0,49
jogurt	/	1	1,2
kokošja jajca	/	2	1,5 (1,0-2,1)
kokošja jajca	kuhanje	2	2,3 (1,7-2,9)

## 2.3 EKSTRAKCIJA

### 2.3.1 SPE in LLE

Ekstrakcija je operacija, s katero odstranjujemo iz trdnih ali tekočih zmesi topne komponente s topilom. V prvi fazi pripravimo zmes topljenca v stiku s topilom, v drugi fazi pa zmes ločimo. Uporabljamo jo za določanje manj hlapnih komponent v vzorcu. Ekstrakcijo opišemo s porazdelitvenim koeficientom (K) ali ekstrakcijskim koeficientom (D). Učinkovitost ekstrakcije je odvisna od porazdelitvenega koeficienta in relativnih volumnov tekočih faz (Kobe in Pollak, 1970).

Ekstrakcija z organskimi topili ali **ekstrakcija v tekočo fazo (LLE – liquid-liquid extraction)** temelji na porazdelitvi učinkovine med topilom in raztopino vzorca. Raztopina vzorca in topilo se ne mešata. Ekstrakcija z organskim topilom temelji na topnosti analita v topilu, ki je nepolarno, saj so biološke tekočine večinoma vodne raztopine. Obvezno moramo pri ekstrakciji imeti zelo čista topila. Boljša je večkratna ekstrakcija z manjšimi volumni. Poskrbeti moramo, da bo topnost spojine v vodi manjša kot v organskem topilu. Topnost analita v organski fazi, glede na njegove fizikalno kemične lastnosti, povečujemo z dodatkom kislin, baz in pufrov, se pravi z uravnavanjem pH vrednosti. Včasih zagotovimo topnost polarnega analita v organskem topilu z derivatizacijo, ki bistveno spremeni fizikalne in kemijske lastnosti analita. Kljub mnogim možnostim, ki nam jih ponuja derivatizacija, se tega postopka izogibamo, saj je manipulacija vzorca zahtevna in lahko doprinese k sipanju rezultatov (Chamberlain, 1985).

Z ekstrakcijo v tekočo fazo lahko dosežemo (Chamberlain, 1985):

- Ekstrakcijo nepolarnega ali šibko polarnega analita v nepolarno organsko topilo.
- Ekstrakcijo motečih nepolarnih komponent v organsko topilo. Na ta način najpogosteje odstranimo lipide, steroidne hormone, nekatere vitamine in podobno. Zelo polaren ali ionski analit ostane v vodni fazi in se ne ekstrahira v organsko topilo.
- Izsoljevanje z dodatkom anorganskih snovi (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. S tem postopkom zmanjšamo topnost sicer polarnim spojinam zaradi povečanja ionske jakosti vzorca.

- Hidroliza spojin, ki so vodotopne v obliki glukuronidov, sulfatov ali podobnih metaboličnih oblik, kot aglikoni netopni v vodnih medijih. Po hidrolizi z analita odstranimo skupine, ki omogočajo raztapljanje le-tega v vodi, nato sledi ekstrakcija z organskim topilom, kamor ekstrahiramo analit.
- Ekstrakcija ionskih parov: z dodatkom ustreznega reagenta, ki z ioniziranim analitom tvori nepolaren ionski par – asociat. Nato sledi ekstrakcija asociatov v organsko topilo.

V zadnjem času ekstrakcijo v tekoči fazi opuščamo, predvsem zaradi zamudnosti, ekoloških omejitev ter uporabe strupenih in hlapnih organskih topil. Avtomatizacija tvorstne ekstrakcijske tehnike je težavna, zato jo vse bolj zamenjuje ekstrakcija na trdni fazi (Krishnan in Ibrahim, 1994).

**Ekstrakcija na trdni fazi (SPE – solid phase extraction)** ima bogato tradicijo, saj so jo omenjali že leta 1923 (Krishnan in Ibrahim, 1994), vendar se je v večjem obsegu razvila šele zadnja leta, ko je tehnologija izdelovanja različnih stacionarnih faz in ekstrakcijskih kolon dosegla velik napredek.

Princip ekstrakcije na trdni fazi zajema več zaporednih postopkov, ki vodijo k izolaciji analita od matriksa (Analytichem International, 1985):

- spiranje kolone z metanolom in kondicioniranje z raztopino ustreznega pufra – A,
- nanos vzorca, ki je navadno raztopljen v pufri – A
- spiranje matriksa s stacionarne faze z mešanico pufra – A in metanola ali kakšnega drugega organskega topila v različnih razmerjih, kar je odvisno od tega, kako močno se analit veže na sorbent v koloni,
- sušenje sorbenta z nadtlakom dušika: navadno traja do tri minute in je posebno pomembno, če stopnji spiranja analita z organskim topilom sledi izparevanje topila do suhega, kot stopnja predkoncentriranja vzorca,
- elucija analita s kolone z ustreznim organskim topilom ali puferno mešanico z ustrežno pH vrednostjo.

Stacionarne faze so napolnjene v plastične ali steklene cevke (kolone). Količina polnila je določena s količino in koncentracijo vzorca tako, da je kapaciteta sorbenta večja kot so

količine analita v vzorcu. Običajno v analizne namene uporabljamo ekstrakcijske kolone, ki imajo od 100 do 500 mg sorbenta. Velikost delcev polnila je okoli 40 µm.

Več vrst sorbentov na tržišču pokriva večino zahtev analitikov v smislu reverzibilne adsorpcije – desorpcije analita (Analytichem International, 1985):

- **Adsorpcijske faze:** silikagel ((SiOH)<sub>n</sub>), florisil (MgO\*SiO<sub>2</sub> = 15:85), aluminijev oksid (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in diatomejska zemlja (SiO)<sub>n</sub>
- **Normalne (polarne) faze:** silikagel, na katerega so vezane amino (-NH<sub>2</sub>), ciano (-CN) ali diolne (-C(OH)C(OH)-) skupine.
- **Reverzne faze (RP):** silikagel, na katerega so vezane metilna (C<sub>1</sub>), etilna (C<sub>2</sub>), heksilna (C<sub>6</sub>), oktilna (C<sub>8</sub>), oktadecilna (C<sub>18</sub>), cianopropilna (-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>CN), cikloheksilna (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>-) in fenilna (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-) skupina.
- **Anionski izmenjevalci:** na polimer stirendivinilbenzena so vezani kvartarni amini, amini in hidrazini.
- **Kationski izmenjevalci:** na polimer stirendivinilbenzena so vezane aromatske sulfonske kisline (-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>SO<sub>3</sub>H) in karboksilne skupine (-COOH).

SPE ekstrakcija, oziroma ekstrakcija na trdni fazi, je metoda za hitro pripravo vzorca s pomočjo tipične SPE kolone.

SPE se uporablja za selektivno ekstrakcijo, koncentriranje in čiščenje analita, kar je tudi cilj same priprave vzorca. SPE metodo uporabljajo za ekstrakcijo ključnih analitov v farmaciji, biomedicini, toksikologiji. V kombinaciji s tekočinsko kromatografijo, SPE doseže cilje ekstrakcije na bolj direkten in ekonomičen način, kot LLE (Louter in sod., 1997).

Prednosti SPE ekstrakcije (Phenomenex, SPE Reference Manual & Users Guide):

- izboljšana selektivnost in specifičnost,
- hitrejša priprava vzorcev, ročno ali avtomatsko,
- večja fleksibilnost,
- eliminacija emulzij,



- uporaba okolju prijaznejših topil in zmanjšana izpostavljenost delavcev pred vnetljivimi in toksičnimi topili,
- koncentriranje ključnih analitov in povečana analitična občutljivost,
- zmožnost optimiziranja separacije s pomočjo uporabe principov kromatografske teorije in generične HPLC metode.

Tako kot pri ekstrakciji v tekoči fazi je tudi tukaj mogoče uporabljati kolone na različne načine. Običajno ekstrahiramo analit iz vzorca tako, da moteče substance speremo s sorbenta, lahko pa uporabimo sorbent tako, da le ta zadrži del matriksa, prečiščen analit, ki se ne zadrži na koloni, pa uporabimo za kromatografsko določitev. Zakonitosti ekstrakcije na trdni fazi so podobne kot pri kromatografiji, tudi polnila so podobna, zato lahko poznavanje kromatografskih parametrov analita na določenih kromatografskih kolonah veliko pripomore k optimalnem oblikovanju ekstrakcijskega postopka na trdni fazi. Ekstrakcijsko kolono lahko tudi direktno vključimo v kromatografski sistem, kar omogoča še manjšo manipulacijo z vzorcem in s tem manjšo napako meritve. V tem primeru lahko uporabljamo za elucijo le mobilno fazo, ki je namenjena za kromatografijo (Louter in sod., 1997).

## 2.4 METODE DOLOČANJA

Največ uporabljajo kromatografske metode, kot sta TLC in HPLC. Pri svojem delu sem uporabila HPLC zato nekaj bolj podrobno le o tej tehniki.

### 2.4.1 Kromatografska metoda visoke ločljivosti (HPLC)

Kromatografija je fizikalna metoda separacije, kjer se komponente vzorca ločujejo na osnovi različnih mehanizmov, ki so pogojeni s stacionarno in mobilno fazo v določeni smeri (Prošek in Golc Wondra, 1997).

Mobilna faza pronica skozi stacionarno fazo v določeni smeri. Kromatografski proces, ki pri tem nastaja, je rezultat ponavljajočega se dejanja sorpcije in desorpcije s stacionarno fazo, ki poteka med potovanjem komponent vzdolž kolone. Do separacije pride zaradi razlik v porazdelitvenih koeficientih posameznih komponent vzorca, ki so posledica različnih termodinamskih lastnosti topljencev. Topljenci, ki se bolje topijo v mobilni fazi

pridejo hitreje iz kolone, kot topljenci, ki se zadržujejo na stacionarni fazi (Prošek in Golc Wondra, 1997).

Mobilna faza pri tekočinski kromatografiji je tekočina majhne viskoznosti. Stacionarne faze so porozni mikrodelci iz različnih substanc, med najpomembnejšimi so silikagel, porozni organski polimeri, v zadnjem času tudi porozni grafit (Prošek in Golc Wondra, 1997).

V primerih, ko zaradi večje učinkovitosti separacije uporabljamo stacionarne faze z velikostjo delcev 10 µm ali manj (HPLC), je potrebno raztopljeni vzorec potiskati skozi kolono skupaj z mobilno fazo pod visokim tlakom (200 barov). Za potiskanje topila skozi kolono uporabljamo črpalke. Ti pogoji omogočajo separacijo večkomponentne mešanice v nekaj minutah. HPLC je postala nepogrešljiva metoda za separacijo in določevanje večine organskih in anorganskih spojin. Odlikuje se po hitrosti, občutljivosti, ločljivosti, majhni količini vzorca ter večkratni uporabi kolone in je zato že povsem izpodrinila klasično kolonsko tekočinsko kromatografijo (Prošek in Golc Wondra, 1997).

Na kromatografsko kolono, polnjeno z definirano stacionarno fazo, nanese bister vzorec. S pronicanjem mobilne faze oziroma kombinacije mobilnih faz (gradientna ločba), skozi kolono, zaradi razlik v porazdelitvenih koeficientih posameznih komponent vzorca, pride do ločevanja le teh. Ločene komponente potujejo v detektor, kjer posamezne električne signale zabeležimo kot ustrezen zapis, kromatografski vrh. Celoten zapis imenujemo kromatogram, kjer so posamezni kromatografski vrhovi komponent definirani z retencijskimi časi (Prošek in Golc Wondra, 1997).

Kromatogram nam daje informacije o:

- sestavi vzorca (število vrhov),
- kvalitativni sestavi vzorca (položaj vrhov),
- količini posamezne komponente v vzorcu (površina vrhov),
- kvaliteti kolone (število teoretskih podov).

Osnovne komponente HPLC sistema so: rezervoar z mobilno fazo, črpalka, injektor, kolona, detektor in rekorder (integrator - PC računalnik) (Prošek in Golc Wondra, 1997).

### **Optimizacija kromatografskih pogojev**

Spremenljivke, ki vplivajo na trajanje kromatografske separacije, delimo na kinetične in termodinamske. Termodinamske spremenljivke kontrolirajo relativno retencijo in so vključene v selektivnostni faktor in enačbo ločljivosti. Kinetične spremenljivke so zajete v koeficientih Van Deemtrjeve enačbe, odražajo se v razširitvi kromatografskega vrha in s tem v višini teoretskega poda. Odvisne so od lastnosti mobilne faze, velikosti delcev in geometrije kolone (Matissek in Wittkowski, 1992). V praksi sta separacijski čas in dolžina kolone kontrolirani s padcem tlaka, ki je pomemben parameter pri vsaki optimizacijski shemi.

Povečana učinkovitost je potrebna v naslednjih primerih (Matissek in Wittkowski, 1992):

- kadar optimizacija stacionarne in mobilne faze ne uspe zadovoljivo povečati selektivnost kritičnih parov komponent,
- kadar ne moremo zadovoljivo povečati kapacitivnih faktorjev spojine,
- kadar je mešanica, ki jo separiramo, preveč komplicirana, tako da ni možna optimizacija selektivnosti.

Učinkovitost lahko povečamo na naslednje načine (Matissek in Wittkowski, 1992):

- z uporabo polnjenih mikro kolon premera 0,2 – 0,5 mm,
- s kapilarnimi kolonami, ki jih delimo na polnjene mikro kolone s premerom 0,05 do 0,2 mm, ter na kapilarne kolone s premerom 0,006 do 0,01 mm,
- s serijsko povezavo več, klasično polnjenih analitskih kolon.

Večjo učinkovitost polnjenih kolon dosežemo z uporabo manjših delcev polnila in z daljšimi kolonami. Obstajajo torej različni pristopi k optimizaciji separacijskih pogojev (Matissek in Wittkowski, 1992):

- skušamo doseči optimalno ločljivost, pri optimalni linearni hitrosti mobilne faze, z minimalno višino poda,

- poskušamo separirati mešanico na koloni dane dolžine, v najkrajšem možnem času,
- prizadevamo si separirati mešanico pri dani učinkovitosti kolone oz. številu teoretskih podov (N), z minimalno dolžino kolone, v najkrajšem možnem času.

## 2.5 VALIDACIJA

Osnova zagotavljanja kvalitete v analiznem laboratoriju je uporaba validiranih metod. Vsak analitik mora biti usposobljen za validacijo metod, ki jih uporablja pri svojem delu. Na kvaliteto opravljenega dela, to je analize, vplivajo predvsem pravilno izbrane in izvedene analizne metode. Posebno so pomembni dogodki, ki se zgodijo med izvajanjem analize.

Vsi obstoječi sistemi za zagotavljanje kvalitete v laboratoriju zahtevajo, da se analize vršijo po validiranih metodah, na umerjenih instrumentih, z izobraženimi in sposobnimi analitiki. Analitik mora poznati vzroke in možne vplive napak in planirati validacijo tako, da imajo dobljeni rezultati realen smisel. Validacija mora biti pripravljena tako, da nudi analitiku jasno predstavo od kod in zakaj prihajajo napake in kako je mogoče med merjenjem zmanjševati njihov vpliv, s pomočjo stalne revalidacije sistema merjenja. Osnove za tako razmišljanje moramo iskati v starih definicijah validacije in upoštevati hierarhijo analiznih operacij (Prošek in Golc Wondra, 1997). Preglednica 3 prikazuje hierarhijo v analizni kemiji in istočasno tudi ustrezen tip validacije.

**Preglednica 3** - Hierarhija analiznih opravil (Prošek, 1996).

opravilo	opis	način validacije
Tehnika (HPLC, TLC, CE, MS, itd)	Znanstveni princip, ki omogoča kvalitativno in kvantitativno merjenje	Splošna validacija
Metoda (določevanje CoQ <sub>10</sub> s HPLC)	Natančno izbrana in izdelana uporaba tehnike za specifična določevanja.	Specifična validacija
Postopek (navodila v farmakopejah)	Napisana navodila za uporabo metode	Sistem suitability test (test ustreznosti sistema)
Protokol	Set dogovorjenih navodil, ki jih moramo upoštevati, če želimo verodostojnost rezultatov	

Uspešnost validacije je odvisna od tega, kako dobro poznamo teoretične osnove analizne tehnike, ki smo jo uporabili za dokazovanje posameznih komponent v vzorcu. Če hočemo validirati neko metodo, moramo pripraviti plan dela v laboratoriju, izvesti meritve, ki nedvoumno odgovorijo na zastavljena vprašanja in vse skupaj natančno dokumentirati. Po priporočilih dobre laboratorijske prakse ali GLP (good laboratory practice) moramo pri validaciji metode določiti naslednje parametre: selektivnost, natančnost (znotraj dneva in med dnevi), zanesljivost, linearnost, delovno območje, mejo detekcije in kvantizacije in robustnost metode (stabilnost raztopin vzorca ter standarda) (Prošek, 1996).

**Selektivnost metode** ugotavljamo tako, da analiziramo različne vzorce, od čistih standardnih raztopin do vzorcev kompleksnih matrik. Preiskovanemu vzorcu dodajamo nečistoče ali moteče snovi. Za vsak primer posebej moramo ugotoviti, katere snovi vplivajo na določitev preiskovane lastnosti. Analizna metoda je selektivna, če na določeno lastnost ene komponente v mešanici ne vpliva nobena druga komponenta iz te mešanice (Prošek in Golc Wondra, 1997).

**Ustreznost sistema** zagotavljamo s specifičnim testom ustreznost sistema (SST), ki ga izvajamo vsak dan pred začetkom validacije. Preverjamo naslednje parametre: ponovljivost injiciranja (RSD = relativni standardni odklon), število teoretskih podov (N), obliko kromatografskega vrha (T) in kapacitivni faktor ( $k'$ ) (Prošek in Golc Wondra, 1997).

**Natančnost ali preciznost metode** nam pove, koliko rezultati znotraj skupine meritev med seboj nihajo. Običajno jo podamo kot standardni odklon. Iz vrednosti standardnega odmika meritev pri posamezni metodi lahko ovrednotimo njeno natančnost: čim manjši je standardni odklon, bolj natančna je metoda. Natančnost merimo z večkratnim injiciranjem ponovno pripravljenih raztopin (Prošek in Golc Wondra, 1997).

**Ponovljivost** (repeatability) je natančnost, dobljena iz rezultatov pri ponovljivih pogojih (ista metoda, isti analitik, isti set vzorcev, isti laboratorij). Ponovljivost ugotavljamo znotraj dneva in med dnevi (Prošek in Golc Wondra, 1997).

**Točnost metode** (accuracy) je merilo, s katerim pokažemo, da z uporabo določene analitske metode dobimo pravilne (točne) rezultate. Točnost je merilo stopnje ujemanja rezultatov, ki jih izmerimo z našo metodo, s pravo vrednostjo. Pravo vrednost dobimo na dva načina. Eden je primerjanje rezultatov z referenčno metodo, za katero vemo, da nima sistematske napake. Manjša kot je razlika med povprečjem meritev in pravo (referenčno) vrednostjo, bolj je metoda točna. Drugi način je dodajanje znane koncentracije merjene komponente v matrično raztopino in merjenje pripadajočih signalov. Točnost izrazimo z razmerjem med izmerjenimi in znanimi koncentracijami v odstotkih (%) (Prošek in Golc Wondra, 1997).

**Meja detekcije (DL):** Meja detekcije posamezne metode je tista najnižja koncentracija komponente v vzorcu, ki jo še lahko zaznamo, a jo običajno ne moremo ovrednotiti. V glavnem je to koncentracija, ki je večja ali enaka napaki merjenja metode (Prošek in Golc Wondra, 1997).

**Meja kvantizacije (QL):** Meja kvantizacije je minimalna količina nanešenega vzorca, ki nam da ponovljive meritve (Prošek in Golc Wondra, 1997).

### 3 EKSPERIMENTALNO DELO

Eksperimentalno delo naloge je obsegalo iskanje optimalnih pogojev ekstrakcije koencima Q<sub>10</sub> iz mleka in mlečnih izdelkov in validacijo metode za njegovo vrednotenje z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC).

#### 3.1 MATERIALI

V nalogi so bili uporabljeni sledeči materiali za analizo:

##### 3.1.1 Koencim Q<sub>10</sub> – standard

Uporabili smo koencim Q<sub>10</sub> v prahu, rumene barve, proizvajalca B.M.P.- Bulk medicines & pharmaceuticals GmbH, Batch No.:20030408, 100,0%. Hranili smo ga v zamrzovalniku, tesno zaprtega in zaščitene pred svetlobo. Uporabili smo ga kot delovni standard in kot standardni dodatek za vrednotenje ekstrakcije.

##### 3.1.2 Vzorci

Za vrednotenje ekstrakcije koencima Q<sub>10</sub> in validacijo metode smo uporabili naslednje vzorce mleka in mlečnih izdelkov:

###### 3.1.2.1 Mleko

- Polno alpsko mleko s 3,5 % maščobe, Ljubljanske mlekarne
- Polposneto alpsko mleko z 1,6 % maščobe, Ljubljanske mlekarne
- Vitaminizirano alpsko mleko z 0,5 % maščobe, Ljubljanske mlekarne

###### 3.1.2.2 Mlečni izdelki

Izbrani postopek ekstrakcije smo testirali z določanjem koencima Q<sub>10</sub> v nekaterih mlečnih izdelkih in sicer:

- Krepki kefir, s 3,5 % maščobe, proizvajalca Kele & Kele mlekarne Krepko,
- Kislo mleko, Ljubljanske mlekarne,
- LCA probiotični jogurt, z 1,5 % maščobe, mlekarne Celeia,
- LCA sadni probiotični jogurt z okusom jagode, z 1,3 % maščobe, mlekarne Celeia.

Vzorci smo pred uporabo dobro pretresli, prelili v čašo in homogenizirali z mešanjem na magnetnem mešalu. Za vsak posamezni dan smo odprli nov paket mleka.

## 3.2 METODE DELA

Pri delu smo razvili dve metodi in sicer: ekstrakcija koencima Q<sub>10</sub> iz mleka in mlečnih izdelkov in določanje koencima Q<sub>10</sub> z metodo HPLC. Uporabili smo dva tipa ekstrakcije: LLE in SPE.

### 3.2.1 Določanje koencima Q<sub>10</sub>

Uporabili smo metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti – HPLC. Metodo smo uporabili za določanje koencima Q<sub>10</sub> v mleku in mlečnih izdelkih in za vrednotenje ekstrakcije. Kromatografske pogoje določitve koencima Q<sub>10</sub> smo izvedli z uporabo delovnega standarda raztopine koencima Q<sub>10</sub>.

Reagenti:

- Metanol (Merck p.a.)
- 1,4-dioksan (Merck p.a.)
- Etanol (Merck p.a.)

Aparatura in kromatografski pogoji ločbe:

- Tekočinski kromatograf z variabilnim UV- detektorjem in kolonskim termostatom

HPLC sistem:

Črpalka: Constametric 4100, TSP, USA

Detektor: Spectromonitor 3200, 280 nm, TSP, USA

Kolona: 5μ, C18, 150 x 4,6 mm, Part No: 00F-4435-E0, S/N: 285033-25, Gemini, USA

Avtomatski podajalnik vzorcev: AS 3000, TSP, USA

Volumen injiciranja: 20 μl

Program za obdelavo podatkov: ChromQuest 4,1

Mobilna faza: 1,4-dioksan : metanol : etanol = 5 : 30 : 65 (v/v/v)

Pretok: 1,0 ml/min

Čas analize: 10 min



### **Priprava standardne raztopine (standardnega dodatka in delovnega standarda):**

V 20 ml merilno bučko smo natehtali 10 mg standarda (CoQ<sub>10</sub>), ga raztopili v 6 ml 1,4-dioksana in dopolnili s topilom (2-propanol) do oznake na bučki, (RS1, c = 0,5 mg CoQ<sub>10</sub>/ml – standardni dodatek). To raztopino smo razredčili in sicer smo v 10 ml merilno bučko odpipetirali 1,0 ml raztopine standarda RS1 ter dopolnili s topilom (2-propanol) do oznake, (RS2, c = 0,05 mg CoQ<sub>10</sub>/ml – delovni standard).

## **3.2.2 Ekstrakcija koencima Q<sub>10</sub>**

### 3.2.2.1 LLE

#### Aparatura

- Tehnica AX205, Mettler toledo, Nemčija
- Vibromix 204EV, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Centrifuga Centric 332A, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Rotavapor R-144 opremljen z vodno kopeljo B-480, Buchi, Flawil, Švica

#### Reagenti

- 2-propanol (Merck p.a.)
- 1,4- dioksan (Merck p.a.)
- Heksan (Merck p.a.)
- Destilirana voda
- Perklorna kislina (100 %) (Merck p.a.); Pripravili smo 10 % vodno raztopino perklorne kisline tako, da smo v 100 ml merilno bučko odpipetirali 10 ml perklorne kisline in dopolnili z destilirano vodo do oznake.
- Kloroform (Merck p.a.)

#### Priprava raztopine vzorca : LLE postopek

V plastično centrifugirko smo zatehtali 1 g homogeniziranega vzorca. Dodali smo 500 µl 10 % perklorne kisline in mešali na vrtinčniku 0,5 minute, nato smo dodali še 2 ml heksana in mešali na vrtinčniku še 1 minuto, sledilo je centrifugiranje (3500 obr/min, 5 min) v centrifugi Centric 332A. Heksansko fazo smo dekantirali v rotavaporsko bučko, preostanek v centrifugirki pa smo še 3x ekstrahirali z 2 ml kloroforma. Organsko fazo smo dodali v

rotavapor bučko. Združene organske faze smo uparili pri znižanem tlaku pri 40 °C skoraj do suhega. Oljnat preostanek smo raztopili v 1 ml 2-propanola in to pustili stati 1 uro pri sobni temperaturi. Za HPLC analizo smo raztopino vzorca prefiltrirali skozi membranski filter (Millipore Millex-HV, Hydrophilic PVDF, velikost por 0,45 µm) in nato filtrat injicirali v HPLC sistem.

Za vrednotenje ekstrakcije koencima Q<sub>10</sub> iz mleka in mlečnih izdelkov smo v vzorec dodali znan volumen standardne raztopine koencima Q<sub>10</sub> in postopek nato izvedli enako kot za vzorec.

### 3.2.2.2 SPE

Aparature:

- Analitska tehtnica AX205, Mettler Toledo, Nemčija
- Cartridge oz. sorbent strata C18-E, Phenomenex, USA
- Rotavapor R-144 opremljen z vodno kopeljo B-480, Buchi, Flawil, Švica
- Ekstraktor na trdni osnovi

Reagenti:

- Metanol (Merck p.a.)
- Acetonitril (Merck p.a.)
- Kloroform (Merck p.a.)

#### Priprava raztopine vzorca: SPE postopek

1 ml vzorca (mleko in mlečni izdelki) smo redčili z 20 % metanolom v razmerju 1:1 (v/v). Tako dobljenemu vzorcu smo dodali znan volumen standarda RS1. Vzorec, ki smo ga najprej nanegli na ekstrakcijsko kolono, smo enkrat spirali s 100 % metanolom in nato spirali z acetonitrilom ter z raztopino acetonitrila in kloroforma v razmerju 80:20 (v/v) in nazadnje še z raztopino acetonitrila in kloroforma v razmerju 20:80 (v/v) (preglednica 4). Drugo frakcijo (2. fr.) smo posušili na rotavaporju do suhega, preostanek pa smo raztopili v 1 ml 2-propanola. Dobljeno raztopino smo analizirali na HPLC sistemu.

**Preglednica 4** - Postopek za SPE

	frakcija	topilo	volumen (ml)	hitrost spiranja (ml/s)
1. kondicioniranje	ow	metanol	4	2
2. nanos vzorca	ow	1 ml vzorca + X*( $\mu$ l) RS1	0,5	0,5
3. spiranje	ow	metanol	4	2
4. spiranje	ow	acetonitril	2	2
5. spiranje	1. fr.	acetonitril:kloroform = 80:20 (v/v)	2	2
6. spiranje	2. fr.	acetonitril:kloroform = 20:80 (v/v)	4	2

\* dodan volumen standardne raztopine koencima Q<sub>10</sub>

ow (organic waste) – organski odpadek

### 3.2.3 Validacija analiznega postopka (HPLC) določanja vsebnosti CoQ<sub>10</sub>

#### 3.2.3.1 Vrednoteni parametri validacije

- **Ustreznost kromatografskega sistema:** izvedemo vsak dan pred pričetkom dela tako, da raztopino delovnega standarda injiciramo 5-krat. Parametri ustreznosti in njihovi kriteriji:

- preciznost sistema:  $RSD\ CoQ_{10}\ (%) (CoQ_{10}, n = 5) \leq 2,0\ %$
- število teoretskih podov kolone za standard CoQ<sub>10</sub> :  $N(CoQ_{10}) \geq 2000$
- faktor popačenja kolone:  $T \leq 1,5$
- faktor kapacitivnosti kolone:  $k' \geq 1,5$

Pri čemer je:

RSD – relativni standardni odklon  $RSD(\%) = SD/X \cdot 100$

N – razmerje med višino in površino Gaussove krivulje

T – simetričnost kromatografskih vrhov podajamo kot faktor popačenja (T)

k' – kapacitivni faktor je razmerje med časom, ki ga topljenec prebije v stacionarni fazi in časom, ki ga prebije v mobilni fazi, nanj vpliva sestava topila, stacionarna faza in temperatura, pri kateri izvajamo separacijo

- **Meja detekcije (DL) in meja kvantizacije (QL) za koencim Q<sub>10</sub>:** določili smo jo z redčenjem standardne raztopine do doseženega kriterija za DL razmerje signal/šum  $\geq 3:1$  in za QL  $\geq 10:1$ . Za CoQ<sub>10</sub> je bila ugotovljena meja detekcije 0,5 % (oz. 0,25  $\mu\text{g}$  CoQ<sub>10</sub>/ml). Meja kvantizacije - QL za CoQ<sub>10</sub> pa je 1 % (c = 0,5  $\mu\text{g}$  CoQ<sub>10</sub>/ml) glede na delovno koncentracijo standarda.
- **Potrditev meje kvantizacije (QL) za koencim Q<sub>10</sub>:** izvedli smo tako, da smo pripravili 6 paralelk vzorca mleka po postopku LLE, z dodanim CoQ<sub>10</sub> pri točki QL (1%).
- **Natančnost metode znotraj dneva:** izvedli smo jo tako, da smo pripravili 6 paralelk vzorca mleka (mleko s 3,5 % maščobe) po postopku LLE. Kriterij RSD CoQ<sub>10</sub> (n=6)  $\text{CoQ}_{10} \leq 5,0\%$ .
- **Robustnost metode (stabilnost standardnih in vzorčnih raztopin):** stabilnost standardnih in vzorčnih raztopin smo preverjali še isti dan, ko smo jih pripravili, torej po času t = 0 h ter po 24 h in 48 h hranjenja v hladilniku (T = 2–8 °C) in pri sobni temperaturi (T = 20 °C) v temi. Kriterij RSD CoQ<sub>10</sub> (n=6)  $\text{CoQ}_{10} \leq 2,0\%$ , razlika glede na t = 0 h  $\leq 2\%$ .
- **Točnost metode:** pripravili smo po 3 paralelke vzorca (mleko in mlečni izdelki) z dodano koncentracijo Q<sub>10</sub> pri točki QL (1%), 50 %, 100 %, 150 % glede na delovno koncentracijo standarda. Kriterij, izkoristek  $100 \pm 20\%$ .
- **Selektivnost metode:** selektivnost metode smo ugotavljali z injiciranjem topila, standarda, vzorca in vzorca z dodatkom CoQ<sub>10</sub>. Kriterij: Topilo ne sme imeti odziva na mestu Q<sub>10</sub>, odziv Q<sub>10</sub> v standardu se mora ujemati po t<sub>r</sub> (t<sub>r</sub> = retencijski čas, to je čas, ki poteče med injiciranjem vzorca in trenutkom, ko detektor zazna vrh oz. maksimum vrha  $t_r = t_r' + t_m$ ) z odzivom v vzorcu.

Vsi rezultati meritev znotraj dneva, robustnosti in točnosti morajo biti v intervalu zaupanja meritev pri 95 % zanesljivosti (interval =  $X \pm t \cdot SD$ ).

X – srednja vrednost

t – Studentov faktor (iz tabel)

SD – standardni odklon

## 4 REZULTATI

Cilj naloge je bil vpeljati metodo za določanje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) v mleku in mlečnih izdelkih. Poudarek je bil na iskanju načinov in optimalnih pogojev ekstrakcije (čas, topila) CoQ<sub>10</sub> iz mleka in mlečnih izdelkov. Končno vrednotenje načina ekstrakcije je bilo izvedeno z validacijo z metodo HPLC.

### 4.1 EKSTRAKCIJA

Vzorcu mleka s 3,5 %, 1,6 % in 0,5 % maščobe, brez dodatka standardne raztopine, ki smo ga zato poimenovali kar slepi vzorec, smo določili vsebnost CoQ<sub>10</sub> po postopku LLE opisanem v poglavju 3.2.2 in dobili sledeče rezultate, zbrane v preglednicah 5, 6 in 7. Pripravili smo po 2 paralelke vzorcev in nato izračunali povprečno vsebnost CoQ<sub>10</sub> v mleku s 3,5 %, 1,6 % in 0,5 % maščobe. Povprečne vrednosti smo uporabili pri izračunih izkoristka ekstrakcije in pri validaciji.

**Preglednica 5** - Povprečna vsebnost CoQ<sub>10</sub> µg/ml v mleku s 3,5 % maščobe

Mleko (slepi vzorec) 3,5 % maščobe	Določena slepa CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)
1. paralelka	3,12
2. paralelka	3,28
povprečje	3,20 ± 0,08

**Preglednica 6** - Povprečna vsebnost CoQ<sub>10</sub> µg/ml v mleku z 1,6 % maščobe

Mleko (slepi vzorec) 1,6 % maščobe	Določena slepa CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)
1. paralelka	1,25
2. paralelka	1,09
povprečje	1,17 ± 0,08

**Preglednica 7** - Povprečna vsebnost CoQ<sub>10</sub> µg/ml v mleku z 0,5 % maščobe

Mleko (slepi vzorec) 0,5 % maščobe	Določena slepa CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)
1. paralelka	0,48
2. paralelka	0,44
povprečje	0,46 ± 0,2

#### 4.1.1 LLE

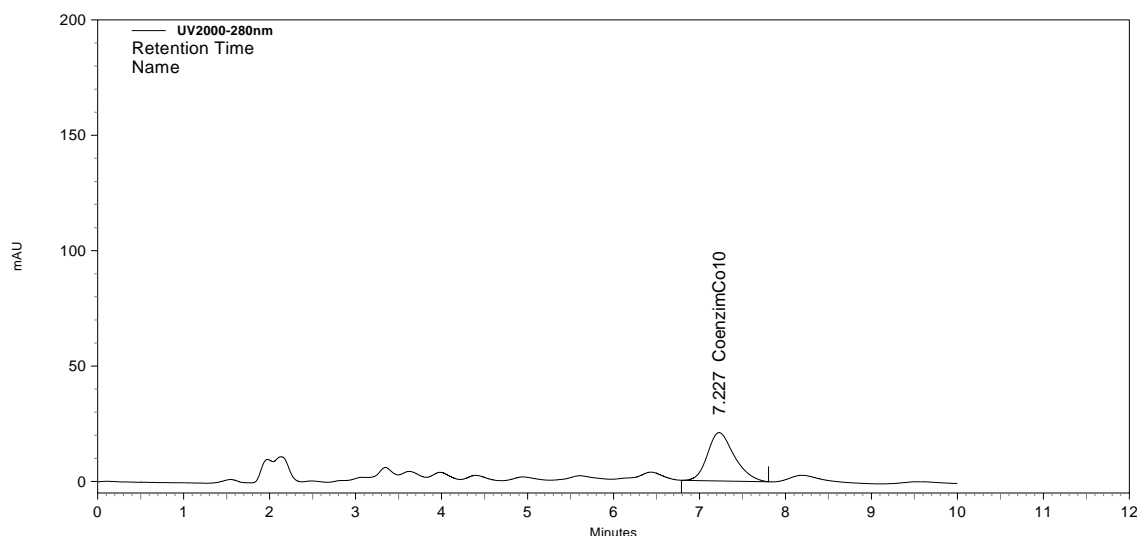
Vzorcju mleka s 3,5 % maščobe, smo dodali 1 µl standardne raztopine CoQ<sub>10</sub> (RS1), kar odgovarja koncentraciji 0,5 µg/ml glede na delovno koncentracijo standarda in postopek priprave raztopin vzorca nadaljevali po postopku LLE, opisanem v poglavju 3.2.2.1. Pripravili smo 6 paralelk raztopin vzorca. Izkoristek ekstrakcije smo izračunali iz znane koncentracije CoQ<sub>10</sub> v vzorcju mleka (določena slepa v preglednici 5), kot razmerje med določenim CoQ<sub>10</sub> po in brez dodatka standarda proti dodanemu CoQ<sub>10</sub>. Rezultati analize so podani v preglednici 8.

**Preglednica 8** - Izkoristek ekstrakcije koencima Q<sub>10</sub> iz mleka s 3,5 % maščobe, s standardnim dodatkom Q<sub>10</sub>, po metodi LLE.

Paralelka	dodan CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)	določen CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)	določen CoQ <sub>10</sub> – določena slepa (µg/ml)	Izkoristek (%)
1. paralelka	0,50	3,64	0,44	<b>88,1</b>
2. paralelka	0,50	3,62	0,42	<b>84,6</b>
3. paralelka	0,50	3,64	0,44	<b>88,4</b>
4. paralelka	0,50	3,64	0,44	<b>88,2</b>
5. paralelka	0,50	3,64	0,44	<b>88,7</b>
6. paralelka	0,50	3,63	0,43	<b>86,5</b>
povprečje	0,50	3,63	0,43	<b>87,4</b>

Iz preglednice 8 je razvidno, da je povprečen izkoristek ekstrakcije 87,4 %, kar je glede na postavljen kriterij za točnost metode ustrezno.

Na sliki 3 je prikazan kromatogram vzorca mleka s 3,5 % maščobe, z dodanim koencimom Q<sub>10</sub>, po ekstrakciji z uporabo LLE.



**Slika 3** - HPLC kromatogram vzorca mleka s 3,5 % maščobe z dodanim koencimom Q<sub>10</sub> po LLE ekstrakciji

#### 4.1.2 SPE

Ekstrakcijo koencima Q<sub>10</sub> iz mleka in mlečnih izdelkov na trdni fazi smo preizkusili z RP sorbentom strata C18-E, po postopku opisanem v poglavju 3.2.2.2. Vzorcju smo dodali 1 µl standardne raztopine CoQ<sub>10</sub> (RS1), kar odgovarja koncentraciji 0,5 µg/ml glede na delovno koncentracijo standarda. Pripravili smo 6 paralelk raztopin vzorca. Izkoristek ekstrakcije smo izračunali kot razmerje med določenim CoQ<sub>10</sub> po in brez dodatka standarda proti dodanim CoQ<sub>10</sub>. Rezultati analize mleka s 3,5 % maščobe so prikazani v preglednici 9.

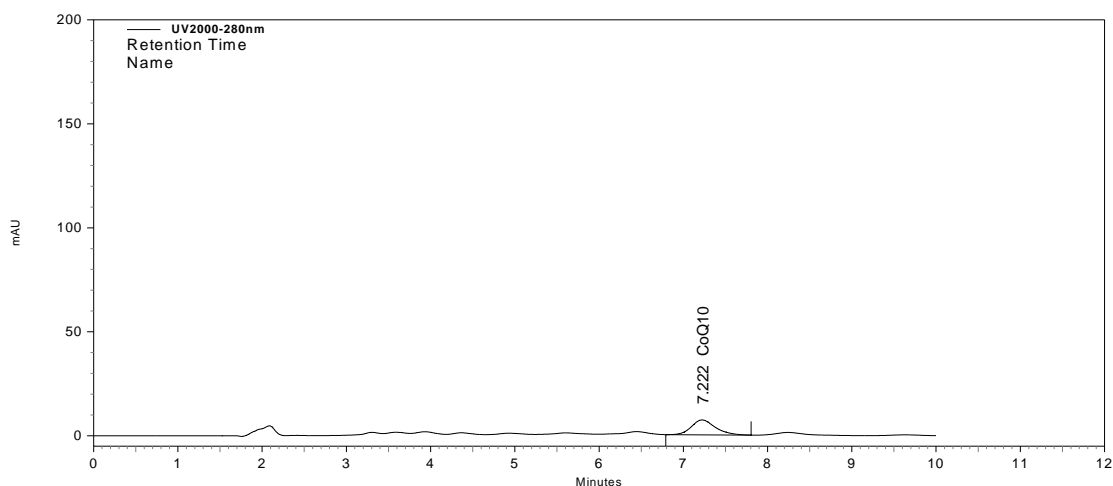
**Preglednica 9** - Izkoristek ekstrakcije koencima Q<sub>10</sub> iz mleka s 3,5 % maščobe, s standardnim dodatkom Q<sub>10</sub>, po metodi SPE.

Paralelka	dodan CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)	določen CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)	določen CoQ <sub>10</sub> – določena slepa (µg/ml)	Izkoristek (%)
1. paralelka	0,50	3,28	0,08	16,1
2. paralelka	0,50	3,28	0,08	16,0
3. paralelka	0,50	3,29	0,09	17,0
4. paralelka	0,50	3,28	0,08	15,6
5. paralelka	0,50	3,28	0,08	16,5
6. paralelka	0,50	3,27	0,07	14,0
povprečje	0,50	3,28	0,08	15,9



Iz preglednice 9 in slike 4 je razvidno, da je izkoristek ekstrakcije nizek, v povprečju samo 15,9 %, kar je glede na postavljen kriterij za točnost metode neustrezno.

Na sliki 4 je prikazan kromatogram vzorca mleka s 3,5 % maščobe, z dodanim koencimom Q<sub>10</sub>, po ekstrakciji z uporabo SPE.



**Slika 4** - HPLC kromatogram vzorca mleka s 3,5 % maščobe, z dodanim koencimom Q<sub>10</sub> po SPE ekstrakciji

V nadaljevanju smo dodajali sledeče volumne raztopine standarda koencima Q<sub>10</sub> z znano koncentracijo: 50 µl, 100 µl in 150 µl RS1, vendar v nobenem primeru izkoristki niso bili višji od 17 % in jih v nalogi ne podajamo.

Zaradi slabih rezultatov že pri mleku s 3,5 % maščobe, ostalih vzorcev mleka po tem postopku nismo pripravili. Zaradi pregoste konsistence, kljub razredčitvi z 20 % vodno raztopino metanola (voda:metanol=20:80, (v/v)), ekstrakcije koencima Q<sub>10</sub> iz mlečnih izdelkov, po tem postopku ni bilo mogoče izvesti. Za nadaljne ekstrakcije smo vedno uporabili LLE metodo ekstrakcije.

## 4.2 VALIDACIJA

### 4.2.1 Ustreznost kromatografskega sistema (SST – system suitability test)

Ustreznost HPLC sistema za delo zahteva najprej ugotavljanje ustreznosti, ki smo jo določali vsak dan, pred pričetkom dela tako, da smo 5-krat zaporedno injicirali standardno raztopino - RS2. Ugotovljeni parametri (RSD, T, k', N) so zbrani v preglednici 10.

**Preglednica 10** - Parametri SST tekom validacije metode

Parametri validacije	RSD (%)	T	k'	N
Ustreznost metode: Natančnost znotraj dneva, Točnost metode za mleko s 3,5 % maščobe	0,35	1,3	3,8	4580
Določitev točke DL in QL	0,06	1,2	2,9	4656
Točnost metode za mleko z 1,6 % maščobe	0,27	1,3	2,8	3358
Potrditev točke QL za mleko s 3,5 % maščobe in za mleko z 1,6 % maščobe	0,21	1,3	2,8	3438
Točnost metode za mleko z 0,5 % maščobe	0,39	1,2	3,1	3843
Potrditev točke QL za mleko z 0,5 % maščobe	0,46	1,2	3,1	3774
Točnost metode za kefir	0,10	1,3	2,8	3358
Potrditev točke QL za kefir	0,31	1,2	2,8	3770

Legenda:

RSD – relativni standardni odklon

T – faktor popačenja

k' – faktor kapacitivnosti ( $k' = t_r / t_m$ )

N – število teoretskih podov

$t_m$  – retencijski čas, ki ga topljenec prebije v mobilni fazi

$t_r$  – retencijski čas, ki ga topljenec prebije v stacionarni fazi

Vse dobljene vrednosti so bile vsak dan v mejah zahtevanih kriterijev, s čimer smo potrdili ustreznost sistema HPLC za delo.

#### 4.2.2 Natančnost metode

Natančnost metode znotraj dneva smo izvedli tako, da smo pripravili 6 paralelek vzorca mleka s 3,5 % maščobe, po postopku LLE in jih analizirali na isti dan. Rezultati so podani v mg CoQ<sub>10</sub> na 1000 ml mleka v preglednici 11.

**Preglednica 11** - Povprečna vsebnost CoQ<sub>10</sub> v mleku s 3,5 % maščobe

<b>vzorci</b>	<b>povprečje (mg CoQ<sub>10</sub>/1000 ml mleka)</b>
Paralelka 1	3,55
Paralelka 2	3,98
Paralelka 3	3,75
Paralelka 4	3,61
Paralelka 5	3,67
Paralelka 6	3,70
<b>povprečje</b>	<b>3,71</b>
<b>SD</b>	<b>0,15</b>
<b>RSD</b>	<b>4,09</b>
Interval zaupanja meritev pri 95% zanesljivosti: n = 6, t (0,05, n-1) = 2,571	3,32 – 4,10

Vse meritve so znotraj intervala zaupanja pri 95 % zanesljivosti. Glede na kriterij natančnosti metode ( $RSD \leq 5,0 \%$ ) smo ugotovili, da je metoda dovolj natančna za določanje CoQ<sub>10</sub> v mleku s 3,5 % maščobe.

### 4.2.3 Točnost metode

Točnost metode smo določali z mlekom in mlečnimi izdelki. Najprej smo pripravili osnovno raztopino standarda koencima Q<sub>10</sub> - RS1 s koncentracijo 0,5 mg/ml. Odgovarjajoči volumen te raztopine smo dodali k vzorcu mleka ali mlečnega izdelka in pripravili raztopine za določitev točnosti metode po postopku LLE, opisanem v poglavju 3.2.2.1. Dodali smo 1 µl, 50 µl, 100 µl in 150 µl osnovne raztopine RS1, kar odgovarja koncentraciji pri točki QL 1% (c = 0,5 µg CoQ<sub>10</sub>/ml), 50 % (c = 25 µg CoQ<sub>10</sub>/ml), 100 % (c = 50 µg CoQ<sub>10</sub>/ml) in 150 % (c = 75 µg CoQ<sub>10</sub>/ml), glede na delovno koncentracijo standarda. Za vsako koncentracijo smo pripravili po 3 paralelke. Analizirali smo mleko s 3,5 %, 1,6 % in 0,5 % maščobe. Točnost metode smo izrazili v odstotkih, kot razmerje med dejansko določeno količino (določen CoQ<sub>10</sub> – določena slepa) in dodano količino CoQ<sub>10</sub>.

#### 4.2.3.1 Mleko s 3,5 % mlečne maščobe:

Rezultati teh analiz so zbrani v preglednici 12.

**Preglednica 12** - Točnost metode pri mleku s 3,5 % maščobe

raztopine vzorca (%)*	dodan CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)	določen CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)	določen CoQ <sub>10</sub> – določena slepa (µg/ml)	izkoristek (%)	povprečje (%)	delež (%)
1	0,50	3,71	0,51	<b>101,6</b>		
1	0,50	3,66	0,46	<b>92,1</b>		
1	0,50	3,69	0,49	<b>97,5</b>	<b>97,1</b>	
50	25,00	29,05	25,85	<b>103,4</b>		
50	25,00	25,83	22,63	<b>90,5</b>		
50	25,00	26,39	23,19	<b>92,7</b>	<b>95,5</b>	
100	50,00	47,24	44,04	<b>88,1</b>		
100	50,00	45,52	42,32	<b>84,6</b>		
100	50,00	47,42	44,22	<b>88,4</b>	<b>87,0</b>	
150	75,00	74,15	70,95	<b>94,6</b>		
150	75,00	72,52	69,32	<b>92,4</b>		
150	75,00	72,30	69,10	<b>92,1</b>	<b>93,0</b>	
	<b>povprečje (n = 4)</b>					<b>93,2</b>
	<b>SD</b>					<b>4,43</b>
	<b>RSD</b>					<b>4,75</b>

\* ob upoštevanju koncentracije CoQ<sub>10</sub> v standardni raztopini

Interval zaupanja nam pove območje, v katerem se z vnaprej izbrano verjetnostjo, nahaja srednja vrednost meritev. Interval zaupanja smo za posamezno koncentracijo CoQ<sub>10</sub> v standardni raztopini izračunali pri 95 % zanesljivosti (interval =  $x \pm t \cdot SD$ ).

x – srednja vrednost (izkoristek)

t – Studentov faktor (iz tabel)

SD – standardni odklon

n = 3 (število ponovitev)

t (0, 5, n-1) = 4,303 (Studentov faktor – iz tabel)

- za 1 % raztopino vzorca: 76,6 - 117,6 %

- za 50 % raztopino vzorca: 65,8 – 125,2 %

- za 100 % raztopino vzorca: 77,9 – 96,1 %

- za 150 % raztopino vzorca: 87,1 – 98,9 %

Vse meritve so znotraj intervala zaupanja pri 95 % zanesljivosti.

#### 4.2.3.2 Mleko z 1,6 % mlečne maščobe

Rezultati teh analiz so zbrani v preglednici 13.

**Preglednica 13** - Točnost metode pri mleku z 1,6 % maščobe

raztopine vzorca (%)*	dodan CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)	določen CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)	določen CoQ <sub>10</sub> – določena slepa (µg/ml)	izkoristek (%)	povprečje (%)	Delež (%)
1	0,50	1,67	0,49	99,4		
1	0,50	1,61	0,44	88,6		
1	0,50	1,65	0,48	96,3	94,8	
50	25,00	24,02	22,84	91,4		
50	25,00	26,02	24,84	99,4		
50	25,00	22,85	21,68	86,7	92,2	
100	50,00	44,43	43,26	86,5		
100	50,0	44,14	42,96	85,9		
100	50,00	45,84	44,67	89,3	87,2	
150	75,00	77,89	76,71	102,3		
150	75,00	78,24	77,07	102,8		
150	75,00	77,61	76,44	101,9	102,3	
	<b>povprečje (n = 4)</b>					94,1
	<b>SD</b>					6,30
	<b>RSD</b>					6,70

**\* ob upoštevanju koncentracije CoQ<sub>10</sub> v standardni raztopini**

Interval zaupanja meritev pri 95 % zanesljivosti :

n = 3

t (0, 5, n-1) = 4,303

- za 1 % raztopino vzorca: 70,9 – 118,7 %
- za 50 % raztopino vzorca: 62,6 – 121,8 %
- za 100 % raztopino vzorca: 79,4 – 95,0 %
- za 150 % raztopino vzorca: 100,4 – 104,2 %

Vse meritve so znotraj intervala zaupanja pri 95 % zanesljivosti.

## 4.2.3.3 Mleko z 0,5 % mlečne maščobe

Rezultati teh analiz so zbrani v preglednici 14.

**Preglednica 14 - Točnost metode pri mleku z 0,5 % maščobe**

raztopine vzorca (%)*	dodan CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)	določen CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)	določen CoQ <sub>10</sub> – določena slepa (µg/ml)	izkoristek (%)	povprečje (%)	delež (%)
1	0,50	0,95	0,49	<b>98,0</b>		
1	0,50	0,96	0,51	<b>100,3</b>		
1	0,50	0,98	0,52	<b>98,9</b>	<b>99,1</b>	
50	25,00	22,71	22,25	<b>89,0</b>		
50	25,00	22,38	21,92	<b>87,7</b>		
50	25,00	23,56	23,10	<b>92,4</b>	<b>88,1</b>	
100	50,00	43,90	43,44	<b>86,9</b>		
100	50,00	43,25	42,79	<b>85,6</b>		
100	50,00	44,04	43,58	<b>87,2</b>	<b>86,6</b>	
150	75,00	74,60	74,14	<b>98,9</b>		
150	75,00	74,15	73,69	<b>98,3</b>		
150	75,00	74,13	73,67	<b>98,2</b>	<b>98,5</b>	
	<b>povprečje (n = 4)</b>					<b>93,1</b>
	<b>SD</b>					<b>6,64</b>
	<b>RSD</b>					<b>7,13</b>

**\* ob upoštevanju koncentracije CoQ<sub>10</sub> v standardni raztopini**

Interval zaupanja meritev pri 95 % zanesljivosti :

n = 3

$$t(0,5, n-1) = 4,303$$

- za 1 % raztopino vzorca: 94,1 – 104,1 %
- za 50 % raztopino vzorca: 84,9 – 91,3 %
- za 100 % raztopino vzorca: 82,9 – 90,3 %
- za 150 % raztopino vzorca: 96,9 – 100,1 %

Vse meritve so znotraj intervala zaupanja pri 95 % zanesljivosti.

#### 4.2.4 Točnost metode – Mlečni izdelki

Najprej smo določili vsebnost CoQ<sub>10</sub>, po postopku LLE, z vsemi preiskovanimi mlečnimi izdelki brez dodatka standardne raztopine in jih poimenovali slepi vzorci ter dobili rezultate, ki so zbrani v preglednicah 15, 16, 17 in 18.

Točnost metode z mlečnimi izdelki smo določali enako kot je opisano pri točki 4.2.3. Kefirju smo dodali vse koncentracije CoQ<sub>10</sub> (preglednica 19) medtem, ko smo preostalim vzorcem dodali le koncentracijo 50 µg CoQ<sub>10</sub>/ml (preglednica 20). Za vsako koncentracijo smo pripravili po 3 paralelke. Točnost metode smo izrazili v odstotkih, kot razmerje med dejansko določeno količino (določen CoQ<sub>10</sub> – določena slepa) in dodano količino CoQ<sub>10</sub>.

**Preglednica 15** - Povprečna vsebnost CoQ<sub>10</sub> (µg/ml) v kefirju s 3,5 % maščobe

Kefir 3,5 % maščobe (slepi vzorec)	Določena slepa CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)
paralelka 1	0,93
paralelka 2	0,95
povprečje	0,94 ± 0,01

**Preglednica 16** - Povprečna vsebnost CoQ<sub>10</sub> (µg/ml) v kislem mleku

Kislo mleko (slepi vzorec)	Določena slepa CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)
Paralelka 1	0,84
Paralelka 2	0,88
povprečje	0,86 ± 0,02

**Preglednica 17** - Povprečna vsebnost CoQ<sub>10</sub> (µg/ml) v jogurtu z 1,5 % maščobe

LCA probiotični jogurt, 1,5 % maščobe (slepi vzorec)	Določena slepa CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)
Paralelka 1	0,69
Paralelka 2	0,71
povprečje	0,70 ± 0,01



**Preglednica 18** - Povprečna vsebnost CoQ<sub>10</sub> (µg/ml) v jogurtu z 1,3 % maščobe

LCA probiotični jogurt-sadni, 1,3 % maščobe (slepi vzorec)	Določena slepa CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)
Paralelka 1	0,05
Paralelka 2	0,03
povprečje	0,04 ± 0,01

## 4.2.4.1 Kefir

Rezultati teh analiz so zbrani v preglednici 19.

**Preglednica 19** - Točnost metode pri kefirju

raztopine vzorca (%)*	dodan CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)	določen CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)	določen CoQ <sub>10</sub> – določena slepa (µg/ml)	izkoristek (%)	povprečje (%)	delež (%)
1	0,50	1,44	0,50	<b>100,4</b>		
1	0,50	1,44	0,50	<b>100,7</b>		
1	0,50	1,45	0,51	<b>101,1</b>	<b>100,7</b>	
50	25,00	23,49	22,54	<b>90,2</b>		
50	25,00	24,33	23,39	<b>93,6</b>		
50	25,00	23,50	22,56	<b>90,2</b>	<b>91,3</b>	
100	50,00	45,95	45,01	<b>90,0</b>		
100	50,00	46,21	45,27	<b>90,5</b>		
100	50,00	47,03	46,10	<b>92,2</b>	<b>90,9</b>	
150	75,00	76,79	75,85	<b>101,1</b>		
150	75,00	77,72	76,78	<b>102,4</b>		
150	75,00	75,93	74,99	<b>100,0</b>	<b>101,2</b>	
	<b>skupno povprečje</b>					
	<b>povprečje (n = 4)</b>					<b>96,0</b>
	<b>SD</b>					<b>5,69</b>
	<b>RSD</b>					<b>5,93</b>

\* ob upoštevanju koncentracije CoQ<sub>10</sub> v standardni raztopini

Interval zaupanja meritev pri 95 % zanesljivosti :

$$n = 3$$

$$t(0, 5, n-1) = 4,303$$

- za 1 % raztopino vzorca: 99,2 – 102,2 %
- za 50 % raztopino vzorca: 82,9 – 99,7 %
- za 100 % raztopino vzorca: 86,0 – 95,8 %
- za 150 % raztopino vzorca: 96,0 – 106,4 %

Vse meritve so znotraj intervala zaupanja pri 95 % zanesljivosti.

#### 4.2.4.2 Kislo mleko, jogurti LCA 1 in 2

Kislemu mleku in jogurtu LCA (probiotičnemu-navadnemu in sadnemu) smo dodali le 100 % dodatek CoQ<sub>10</sub>. Rezultati teh analiz so zbrani v preglednici 20.

**Preglednica 20** - Točnost metode pri kislem mleku in jogurtih LCA

vzorci	raztopine vzorca (%) <sup>*</sup>	dodan CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)	določen CoQ <sub>10</sub> (µg/ml)	določen CoQ <sub>10</sub> – določena slepa (µg/ml)	izkoris tek (%)	povprečje (%)	SD (%)	RSD (%)
kislo mleko	100	50,00	49,90	49,04	<b>98,1</b>			
kislo mleko	100	50,00	49,28	48,42	<b>96,8</b>			
kislo mleko	100	50,00	51,20	50,34	<b>100,7</b>	<b>98,5</b>	<b>1,97</b>	<b>2,00</b>
LCA 1	100	50,00	49,60	48,90	<b>97,8</b>			
LCA 1	100	50,00	49,67	48,97	<b>97,9</b>			
LCA 1	100	50,00	50,58	49,88	<b>99,8</b>	<b>98,5</b>	<b>1,09</b>	<b>1,11</b>
LCA 2	100	50,00	47,75	47,71	<b>95,4</b>			
LCA 2	100	50,00	48,96	48,92	<b>97,8</b>			
LCA 2	100	50,00	48,74	48,70	<b>97,4</b>	<b>96,9</b>	<b>1,29</b>	<b>1,33</b>

**\* ob upoštevanju koncentracije CoQ<sub>10</sub> v standardni raztopini**

Glede na kriterij za točnost ( $100,0 \pm 20,0$  %) in ponovljivost ( $RSD \leq 10,0$  %) za koencim Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) v območju 1 % do 150 % (oz, od 0,5 µg/ml do 75 µg/ml) glede na koncentracijo CoQ<sub>10</sub> v standardni raztopini, smo ugotovili, da je metoda dovolj točna za določanje CoQ<sub>10</sub> v različnih mlečnih izdelkih.

#### 4.2.5 Potrditev točke QL

Točko QL smo potrjevali ob uporabi naslednjih vzorcev: mleka s 3,5 %, 1,6 % in 0,5 % maščobe ter kefirja. K ustreznim količinam vzorcev smo dodali raztopino standarda CoQ<sub>10</sub> pri točki QL 1 %, in sicer 1 µl RS1 s koncentracijo 0,5 µg/ml glede na delovno koncentracijo standarda, pripravljeno po analiznem postopku LLE, opisanem v poglavju 3.2.2.1. Za vsak vzorec smo pripravili po 6 paralelk. Razmerje med dejansko določeno količino (določen CoQ<sub>10</sub> – določena slepa) in dodano količino CoQ<sub>10</sub> smo izrazili v %.

##### 4.2.5.1 Mleko s 3,5 % mlečne maščobe

Rezultati teh analiz so zbrani v preglednici 21.

**Preglednica 21** - Potrditev točke QL pri mleku s 3,5 % maščobe

vzorci (paralelke)	Koencim Q <sub>10</sub> (CoQ <sub>10</sub> ) Potrditev točke- QL (meja kvantizacije)			izkoristek (%)
	dodan (µg/ml)	določen (µg/ml)	določen CoQ <sub>10</sub> – določena slepa (µg/ml)	
Paralelka 1	0,50	0,52	0,48	<b>96,8</b>
Paralelka 2	0,50	0,53	0,50	<b>100,6</b>
Paralelka 3	0,50	0,55	0,52	<b>103,0</b>
Paralelka 4	0,50	0,56	0,53	<b>105,5</b>
Paralelka 5	0,50	0,53	0,50	<b>100,2</b>
Paralelka 6	0,50	0,55	0,52	<b>103,2</b>
			<b>povprečje (%)</b>	<b>101,6</b>
			<b>RSD (%)</b>	<b>3,0</b>

##### 4.2.5.2 Mleko z 1,6 % mlečne maščobe

Rezultati teh analiz so zbrani v preglednici 22.

**Preglednica 22** - Potrditev točke QL pri mleku z 1,6 % maščobe

vzorci (paralelke)	Koencim Q <sub>10</sub> (CoQ <sub>10</sub> ) potrditev točke- QL (meja kvantizacije)			izkoristek (%)
	dodan (µg/ml)	določen (µg/ml)	določen CoQ <sub>10</sub> – določena slepa (µg/ml)	
Paralelka 1	0,50	0,45	0,44	<b>88,4</b>
Paralelka 2	0,50	0,44	0,43	<b>86,0</b>
Paralelka 3	0,50	0,45	0,44	<b>87,7</b>
Paralelka 4	0,50	0,50	0,48	<b>96,8</b>
Paralelka 5	0,50	0,52	0,50	<b>100,8</b>
Paralelka 6	0,50	0,45	0,44	<b>87,5</b>
			<b>povprečje (%)</b>	<b>91,2</b>
			<b>RSD (%)</b>	<b>6,7</b>

## 4.2.5.3 Mleko z 0,5 % mlečne maščobe

Rezultati teh analiz so zbrani v preglednici 23.

**Preglednica 23** - Potrditev točke QL pri mleku z 0,5% mlečne maščobe

vzorci (paralelke)	Koencim Q <sub>10</sub> (CoQ <sub>10</sub> ) Potrditev točke- QL (meja kvantizacije)			izkoristek (%)
	dodan (µg/ml)	določen (µg/ml)	določen CoQ <sub>10</sub> – določena slepa (µg/ml)	
Paralelka 1	0,50	0,52	0,52	<b>103,6</b>
Paralelka 2	0,50	0,51	0,51	<b>101,7</b>
Paralelka 3	0,50	0,48	0,47	<b>94,3</b>
Paralelka 4	0,50	0,51	0,51	<b>101,8</b>
Paralelka 5	0,50	0,51	0,50	<b>101,0</b>
Paralelka 6	0,50	0,48	0,47	<b>94,7</b>
			<b>povprečje (%)</b>	<b>99,5</b>
			<b>RSD (%)</b>	<b>4,0</b>

## 4.2.5.4 Kefir

Rezultati teh analiz so zbrani v preglednici 24.

**Preglednica 24** - Potrditev točke QL pri kefirju

vzorci (paralelke)	Koencim Q <sub>10</sub> (CoQ <sub>10</sub> ) potrditev točke- QL (meja kvantizacije)			izkoristek (%)
	dodan (µg/ml)	določen (µg/ml)	določen CoQ <sub>10</sub> – določena slepa (µg/ml)	
Paralelka 1	0,50	0,46	0,45	<b>90,5</b>
Paralelka 2	0,50	0,50	0,49	<b>98,0</b>
Paralelka 3	0,50	0,47	0,46	<b>92,8</b>
Paralelka 4	0,50	0,47	0,46	<b>91,3</b>
Paralelka 5	0,50	0,47	0,46	<b>92,6</b>
Paralelka 6	0,50	0,46	0,45	<b>90,7</b>
			<b>povprečje (%)</b>	<b>92,7</b>
			<b>RSD (%)</b>	<b>3,0</b>

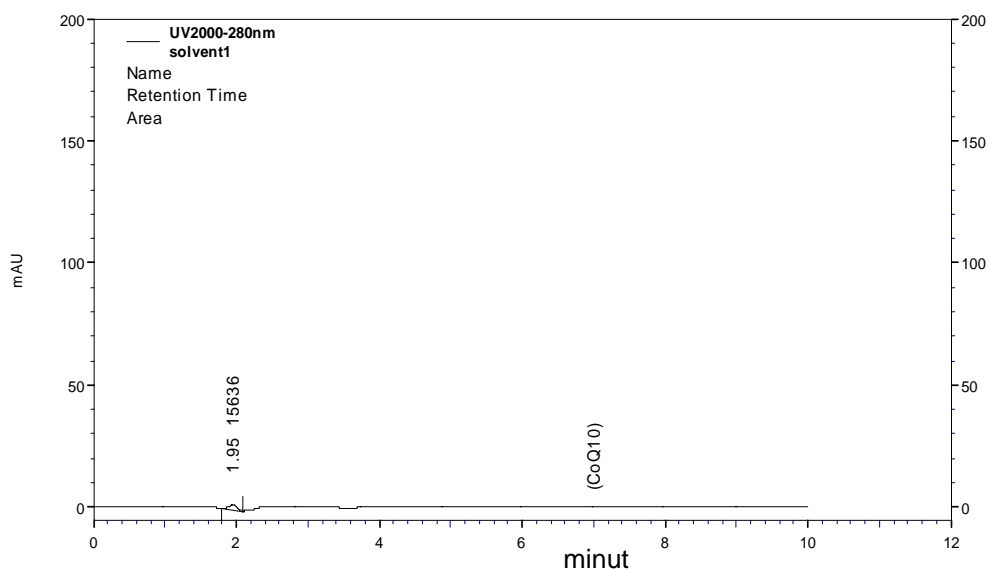
Glede na toleranco razmerja pri limiti kvantizacije (100,0 % ± 20,0 %) in ponovljivost (RSD ≤ 10,0 %) smo potrdili točko QL za določanje CoQ<sub>10</sub> v mleku in mlečnih izdelkih.

#### 4.2.6 Selektivnost metode

Selektivnost oziroma specifičnost metode smo določili z zaporednim injiciranjem sledečih raztopin v kromatografski sistem:

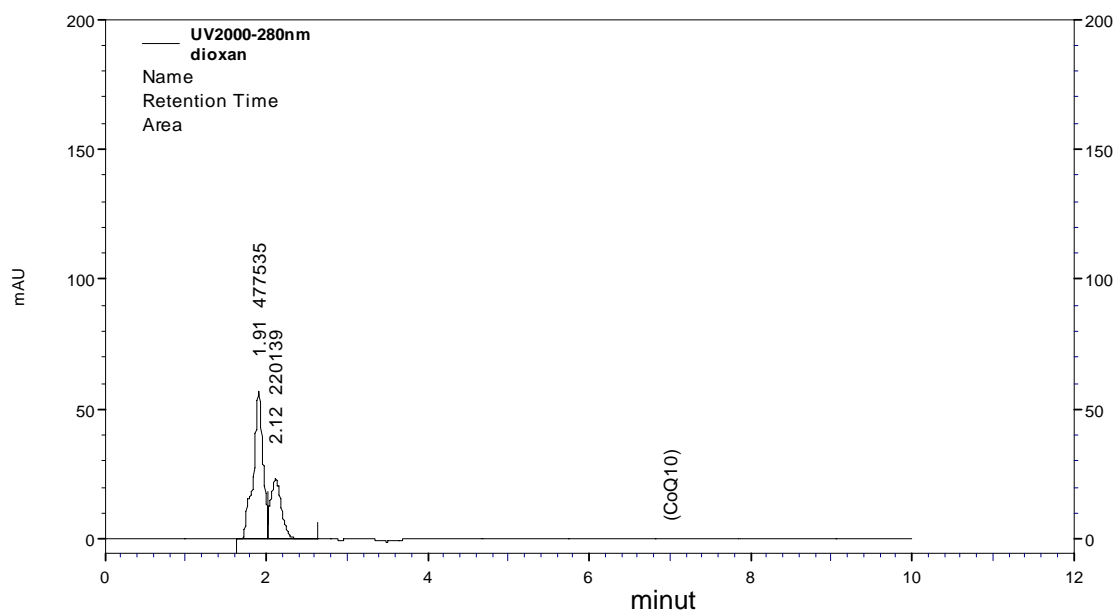
- topilo 1 (2-propanol)
- topilo 2 (1,4-dioksan)
- mobilna faza (1,4-dioksan : metanol : etanol = 5 : 30 : 65 (v/v/v))
- standardna raztopina (RS2)
- vzorčna raztopina: mleko s 3,5 % m.m.
- vzorčna raztopina: mleko z 1,6 % m.m.
- vzorčna raztopina: mleko z 0,5 % m.m.
- vzorčna raztopina: kefir

Na sliki 5 je prikazan kromatogram topila 1 (2-propanol) pri izbranih pogojih.



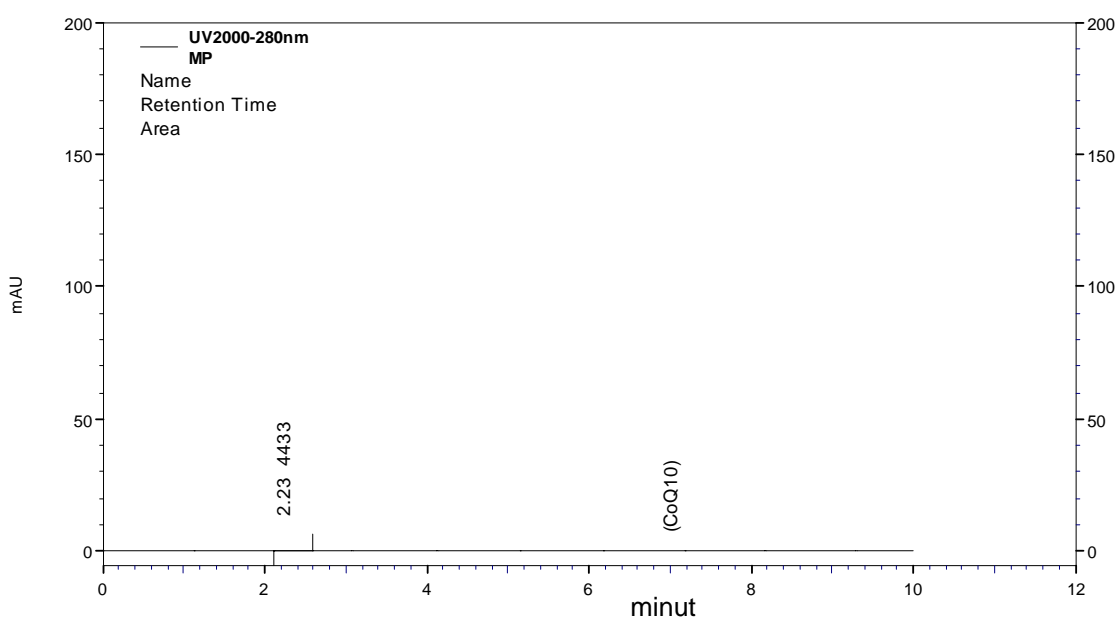
**Slika 5** - HPLC kromatogram topila 1: 2 - propanol (kromatografski pogoji: valovna dolžina: 280 nm, kolona: 5 $\mu$ , C18, 150 x 4,6 mm, Gemini, volumen injiciranja: 20  $\mu$ l, pretok: 1,0 ml/min, čas analize: 10 min)

Na sliki 6 je prikazan kromatogram topila 2 (1,4-dioksan) pri izbranih pogojih.



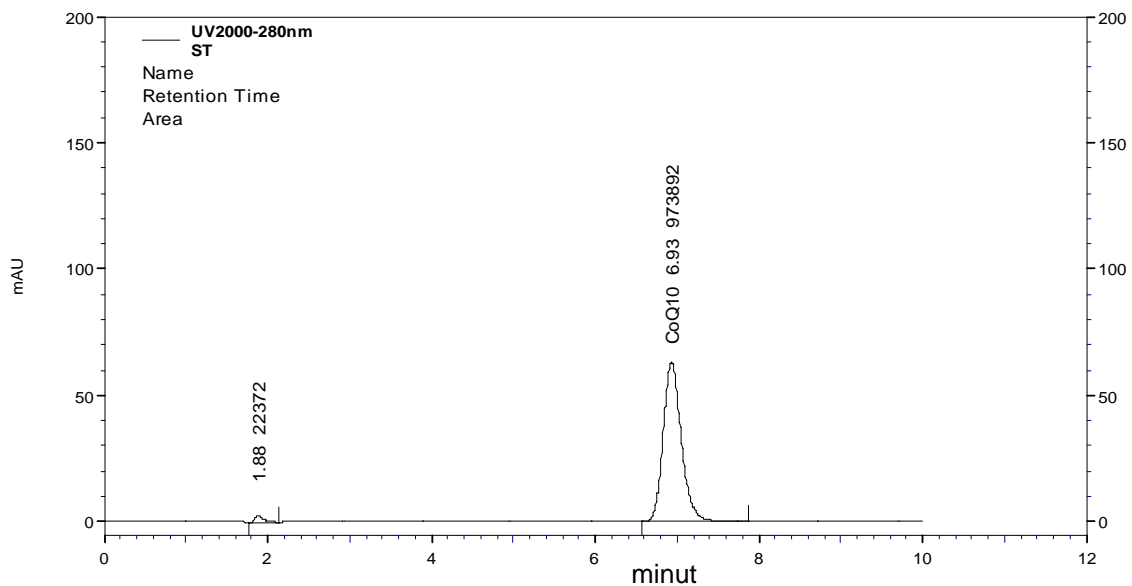
Slika 6 - HPLC kromatogram topila 2: 1,4-dioksan (kromatografski pogoji enaki, kot pri sliki 5)

Na sliki 7 je prikazan kromatogram mobilne faze pri izbranih pogojih.



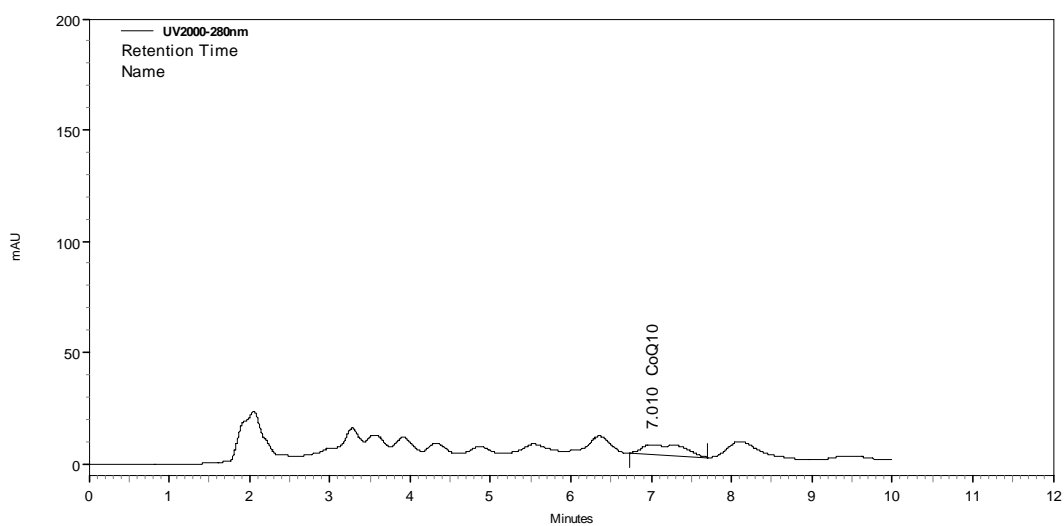
Slika 7 - HPLC kromatogram mobilne faze (kromatografski pogoji enaki, kot pri sliki 5)

Na sliki 8 je prikazan kromatogram raztopine standarda koencima Q<sub>10</sub> pri izbranih pogojih.



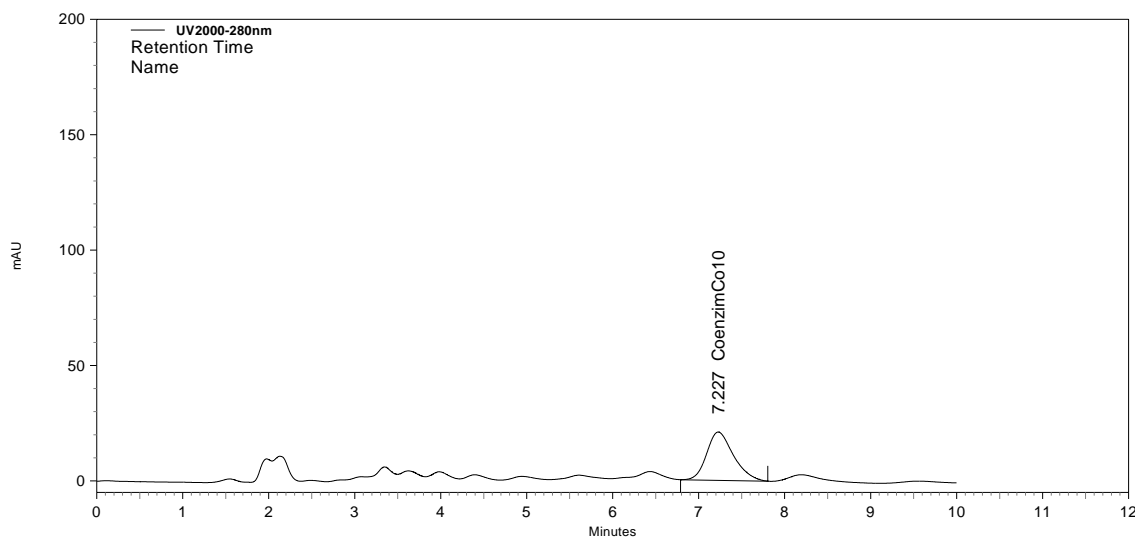
**Slika 8-** HPLC kromatogram raztopine standarda koencima Q<sub>10</sub> (kromatografski pogoji enaki, kot pri sliki 5)

Na sliki 9 je prikazan kromatogram vzorca mleka s 3,5 % maščobe, pri izbranih pogojih.



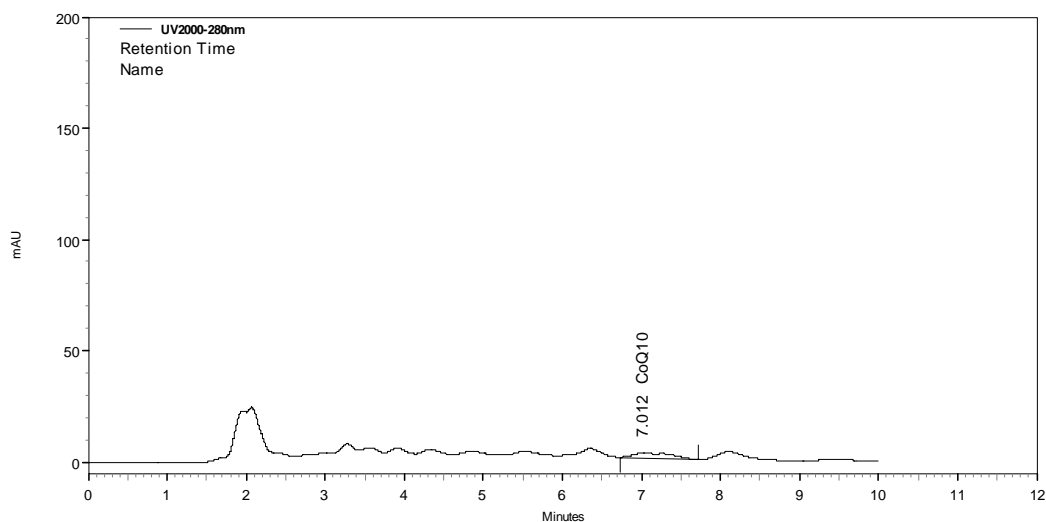
**Slika 9 -** HPLC kromatogram vzorca mleka s 3,5 % maščobe (kromatografski pogoji enaki, kot pri sliki 5)

Na sliki 10 je prikazan kromatogram vzorca mleka s 3,5 % maščobe, z dodanim koencimom Q<sub>10</sub> pri izbranih pogojih.



**Slika 10** - HPLC kromatogram vzorca mleka s 3,5 % maščobe z dodanim koencimom Q<sub>10</sub> (kromatografski pogoji enaki, kot pri sliki 5)

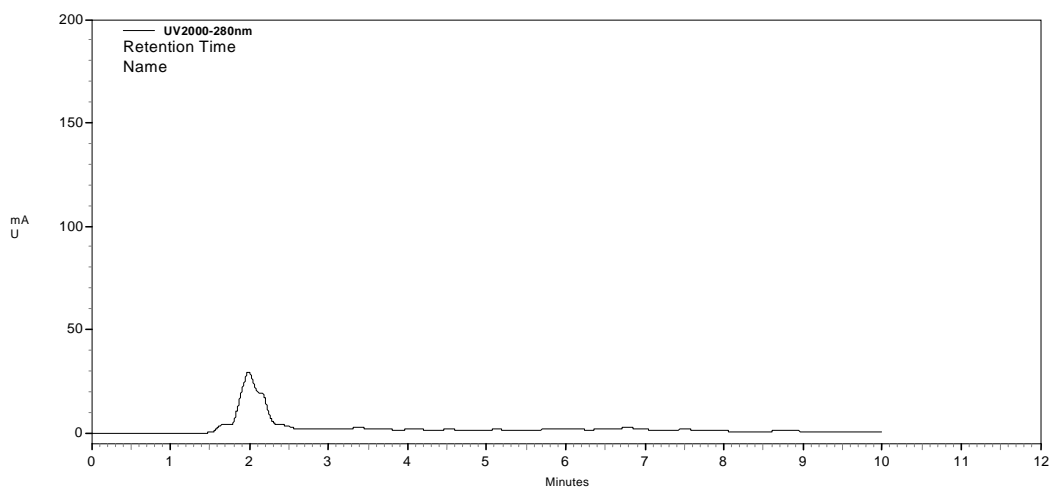
Na sliki 11 je prikazan kromatogram vzorca mleka z 1,6 % maščobe, pri izbranih pogojih.



**Slika 11** - HPLC kromatogram vzorca mleka z 1,6 % maščobe (kromatografski pogoji enaki, kot pri sliki 5)



Na sliki 12 je prikazan kromatogram vzorca mleka z 0,5 % maščobe, pri izbranih pogojih.



**Slika 12** - HPLC kromatogram vzorca mleka z 0,5 % maščobe (kromatografski pogoji ločbe enaki, kot pri sliki 5)

Iz kromatogramov topila (slika 5, 6) in mobilne faze (slika 7) je razvidno, da na mestu kromatografskega vrha koencima Q<sub>10</sub> ni drugih vrhov, ki bi motili določanje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub>. Retencijski čas koencima v analiziranem vzorcu mleka, se ujema z retencijskim časom koencima v raztopini standarda. Iz kromatogramov raztopin vzorcev vidimo, da je največji odziv koencima Q<sub>10</sub> pri mleku s 3,5 % maščobe, oziroma ga pri mleku z 0,5 % maščobe sploh ni.

Glede na kriterije za selektivnost (kromatogrami topila in mobilne faze ne vsebujejo nobenih kromatografskih vrhov, ki bi motili odziv aktivne komponente CoQ<sub>10</sub> v mleku in mlečnih izdelkih) smo ugotovili, da je metoda selektivna za določanje in identifikacijo koencima Q<sub>10</sub> v vzorcih mleka in mlečnih izdelkov.

#### 4.2.7 Robustnost metode

##### 4.2.7.1 Stabilnost raztopin vzorcev in standardnih raztopin

Stabilnost raztopin vzorcev mleka, s 3,5 % maščobe, pripravljene po analiznem postopku LLE (poglavje 3.2.2.1), smo določili tako, da smo 3 paralelke homogenih vzorcev analizirali na dan, ko so bile pripravljene ( $t = 0$  h) ter po 24 h in 48 h hranjenja v hladilniku (2–8 °C) in pri sobni temperaturi. Ravno tako smo analizirali tudi po 2 paralelki standardne

raztopine RS2 – delovni standard, pripravljene po postopku priprave standardne raztopine opisane v poglavju 3.2.1 (preglednica 25).

### **Stabilnost raztopin vzorcev hranjenih v hladilniku pri temperaturi 2 - 8 °C v temi in pri sobni temperaturi**

Raztopine vzorcev med hranjenjem niso bile stabilne. Po 12-ih urah so se pojavili beli kosmiči, zato analize ni bilo mogoče izvesti.

### **Stabilnost standardnih raztopin hranjenih 48 h v hladilniku pri 2 - 8 °C v temi**

Rezultati so podani glede na sveže pripravljeno standardno raztopino koencima Q<sub>10</sub>. Stabilnost (%) smo ocenili na osnovi primerjave rezultatov prvega dne (t = 0 h, vsebnost 100 %) in tretjega dne (t = 48 h). Rezultati so zbrani v preglednici 25.

**Preglednica 25** - Stabilnost standardnih raztopin, hranjenih v hladilniku pri temperaturi 2 – 8 °C v temi, po času t = 0 h in t = 48 h

	<b>Koencim Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>)</b>
<b>vzorci (paralelke)</b>	<b>standardna raztopina, t = 0 h, hladilnik (2 - 8 °C) (mg/ml)</b>
Standard 1	0,0471
Standard 2	0,0484
<b>povprečje (mg/ml)</b>	<b>0,0477</b>
<b>SD (mg/ml)</b>	<b>0,0009</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>1,89</b>
	<b>standardna raztopina t = 48 h, hladilnik (2 - 8 °C) (mg/ml)</b>
Standard 1	0,0471
Standard 2	0,0484
<b>povprečje (mg/ml)</b>	<b>0,0478</b>
<b>SD (mg/ml)</b>	<b>0,0009</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>1,88</b>
<b>relativna razlika (%)</b>	<b>0,2</b>
<b>stabilnost (%)</b>	<b>standardna raztopina t = 48 h, hladilnik (2 - 8 °C)</b>
Standard 1	100,1
Standard 2	100,1
<b>povprečje(%)</b>	<b>100,1</b>
<b>SD (%)</b>	<b>0,0000</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,00</b>

Glede na kriterije za stabilnost ( $RSD \leq 2,0 \%$ , relativna razlika  $\leq \pm 2,0 \%$ ) in glede na rezultate pri  $t = 0$  h in  $t = 48$  h hranjenja v hladilniku smo potrdili, da je standardna raztopina za določanje CoQ<sub>10</sub> stabilna in prav tako, da je vzorec CoQ<sub>10</sub> stabilen med 48 – urnim hranjenjem v hladilniku pri 2 - 8 °C v temi.

### Stabilnost standardnih raztopin po 48 h hranjenja pri sobni temperaturi v temi

Rezultate smo podali glede na svež standard. Test stabilnosti pa smo ocenili na podlagi primerjave rezultatov pri času hranjenja  $t = 0$  h in  $t = 48$  h pri sobni temperaturi. Rezultati so zbrani v preglednici 26.

**Preglednica 26** - Stabilnost standardnih raztopin, hranjenih pri sobni temperaturi, po času  $t = 0$  h in  $t = 48$  h

	Koencim Q <sub>10</sub> (CoQ <sub>10</sub> )
<b>vzorci (paralelke)</b>	<b>standardna raztopina, t = 0 h, sobna temperatura (mg/ml)</b>
Standard 1	0,0471
Standard 2	0,0484
<b>povprečje (mg/ml)</b>	<b>0,0477</b>
<b>SD (mg/ml)</b>	<b>0,0009</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>1,89</b>
	<b>standardna raztopina t = 48 h, sobna temperatura (mg/ml)</b>
Standard 1	0,0467
Standard 2	0,0490
<b>povprečje (mg/ml)</b>	<b>0,0479</b>
<b>SD (mg/ml)</b>	<b>0,0016</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>3,34</b>
<b>relativna razlika (%)</b>	<b>0,4</b>
<b>stabilnost(%)</b>	<b>standardna raztopina, t=48 h sobna temperatura</b>
Standard 1	99,2
Standard 2	101,3
<b>povprečje (%)</b>	<b>100,3</b>
<b>SD (%)</b>	<b>1,48</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>1,48</b>

Glede na kriterije za stabilnost ( $RSD \leq 2,0 \%$ , relativna razlika  $\leq \pm 2,0 \%$ ) in glede na rezultate pri  $t = 0$  h in  $t = 48$  h hranjenja pri sobni temperaturi smo potrdili, da je standardna raztopina za določanje CoQ<sub>10</sub> stabilna in prav tako, da je vzorec CoQ<sub>10</sub> stabilen med 48 – urnim hranjenjem pri sobni temperaturi v temi.

Povzetek preiskovanih parametrov validacije, njihove kriterije in dobljene rezultate so podani v preglednici 27.

**Preglednica 27** – Povzetek preiskovanih parametrov validacije, njihovi kriteriji in dobljeni rezultati

PARAMETER	KRITERIJI	REZULTATI
<b>Ustreznost sistema</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- RSD (%) <math>\leq 2,0</math> %</li> <li>- Število podov (<math>N \geq 2000</math>)</li> <li>- Faktor popačenja (<math>T \leq 1,5</math>)</li> <li>- Faktor kapacitivnosti (<math>k' \geq 1,5</math>)</li> <li>- Relativna razlika (<math>RD \leq \pm 2,0</math> %)</li> </ul>	Parametri ustrezajo kriterijem. Sistem je ustrezen.
<b>Natančnost - Natančnost znotraj dneva</b> <b>Mleko s 3,5 % maščobe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- RSD (<math>n = 6</math>) <math>\leq 2,0</math> %</li> <li>- Vse meritve so znotraj intervala zaupanja pri 95 % zanesljivosti.</li> </ul>	RSD ( $n = 6$ ) = 4,09% Metoda je natančna.
<b>Točnost metode</b> <b>Mleko s 3,5 % maščobe</b> <b>Mleko z 1,6 % maščobe</b> <b>Mleko z 0,5 % maščobe</b> <b>Kefir</b> <b>Kislo mleko</b> <b>LCA 1 - probiotični jogurt z 1,5 % maščobe</b> <b>LCA 2 - probiotični jogurt z okusom jagode, z 1,3 % maščobe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Posamezni in skupni izkoristek: <math>100,0 \pm 15,0</math> %</li> <li>- Vse meritve so znotraj intervala zaupanja pri 95 % zanesljivosti.</li> </ul>	<p><u>Mleko s 3,5 % maščobe</u>: Metoda je točna v območju med 0,5 <math>\mu\text{g/ml}</math> do 75 <math>\mu\text{g/ml}</math>. Skupni izkoristek je: 93,2 %, RSD = 4,75 %.</p> <p><u>Mleko z 1,6 % maščobe</u>: Metoda je točna v območju med 0,5 <math>\mu\text{g/ml}</math> do 75 <math>\mu\text{g/ml}</math>. Skupni izkoristek je 94,1 %, RSD = 6,70 %.</p> <p><u>Mleko z 0,5 % maščobe</u>: Metoda je točna v območju med 0,5 <math>\mu\text{g/ml}</math> do 75 <math>\mu\text{g/ml}</math>. Skupni izkoristek je 93,1 %, RSD = 7,13 %.</p> <p><u>Kefir</u>: Metoda je točna v območju med 0,5 <math>\mu\text{g/ml}</math> do 75 <math>\mu\text{g/ml}</math>. Skupni izkoristek je 96,0 %, RSD = 5,93 %.</p> <p><u>Kislo mleko</u>: Metoda je točna v območju med 0,5 <math>\mu\text{g/ml}</math> do 75 <math>\mu\text{g/ml}</math>. Skupni izkoristek je 98,5 %, RSD = 2,00 %.</p> <p><u>LCA 1</u>: Metoda je točna v območju med 0,5 <math>\mu\text{g/ml}</math> do 75 <math>\mu\text{g/ml}</math>. Skupni izkoristek je 98,5 %, RSD = 1,11 %.</p> <p><u>LCA 2</u>: Metoda je točna v območju med 0,5 <math>\mu\text{g/ml}</math> do 75 <math>\mu\text{g/ml}</math>. Skupni izkoristek je 96,9 %, RSD = 1,33 %.</p>
<b>Robustnost metode:</b> <b>Stabilnost raztopin</b> <b>vzorcev standardnih raztopin</b> - sobna temperatura, tema - hladilnik (2 - 8 °C), tema	<ul style="list-style-type: none"> <li>- RSD (<math>n = 3</math>) <math>\leq 2,0</math> %</li> <li>- RSD (<math>n = 6</math>) <math>\leq 2,0</math> %</li> <li>- Vse meritve so znotraj intervala zaupanja pri 95 % zanesljivosti.</li> <li>- Relativna razlika <math>\leq \pm 2,0</math> %</li> </ul>	Standardne raztopine so stabilne pri 48 urnem hranjenju pri sobni temperaturi v temi in tudi pri 48 urnem hranjenju v hladilniku (2 - 8 °C) v temi. Raztopine vzorcev niso stabilne.
<b>Selektivnost</b>	Kromatogrami topila in mobilne faze kažejo, da na mestu kromatografskega vrha koencima Q <sub>10</sub> ni vrhov, ki bi motili določanje vsebnosti koencima Q <sub>10</sub> .	Metoda je selektivna.
<b>Validacija analiznega postopka</b>	Po protokolu: L06 – HPLC - 02/ 2005	Metoda je ustrezna za določanje CoQ <sub>10</sub> v mleku in mlečnih izdelkih.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Da bi lahko pripravili funkcionalni mlečni izdelek, s katerim bi vnašali v telo CoQ<sub>10</sub>, smo morali vpeljati metodo za njegovo natančno in zanesljivo določanje in ugotoviti, kakšna je koncentracija ubikinona v izhodiščnih izdelkih.

Koncentracijo CoQ<sub>10</sub> v mleku in mlečnih izdelkih smo določali z uporabo dveh analitičnih metod, in sicer: ekstrakcijo koencima Q<sub>10</sub> iz mleka in mlečnih izdelkov ter določanje in vrednotenje (validacija metode) koencima Q<sub>10</sub> z metodo HPLC. Uporabili smo dva tipa ekstrakcije: ekstrakcija tekoče - tekoče (LLE) in ekstrakcijo na trdni fazi (SPE).

#### 5.1.1 Vsebnost CoQ<sub>10</sub> v mleku in mlečnih izdelkih

Določili smo povprečno vsebnost CoQ<sub>10</sub> v mleku s 3,5 %, 1,6 % in 0,5 % maščobe ter v različnih mlečnih izdelkih. Ker pa je potrebno ugotoviti, kako učinkovita je ekstrakcija, smo dodali CoQ<sub>10</sub> in izračunali izkoristek ekstrakcije.

Povprečna vsebnost CoQ<sub>10</sub> v mleku s 3,5 % maščobe je bila 3,2 µg/ml, kar je zelo podoben rezultat, kot so ga dobili Kamei in sod. (1986). Ti so določali povprečno vsebnost CoQ<sub>10</sub> v kravjem mleku, in dobili koncentracijo 3,5 µg/ml, ob uporabi drugačne metode. CoQ<sub>10</sub> so predhodno raztopili v metanolu, ki je vseboval 100 ppm butil hidroksitoluena - BHT in to uporabili kot standardno raztopino. Priprava vzorca, ki je vključevala saponifikacijo, je bila bolj zapletena in, ker niso podali koliko maščobe je mleko vsebovalo, težko primerjamo rezultate, in ne moremo z zanesljivostjo zaključiti, da smo dobili primerljive rezultate.

V mleku z 1,6 % maščobe smo določili vsebnost 1,17 µg CoQ<sub>10</sub> /ml, v mleku z 0,5 % maščobe pa 0,46 µg CoQ<sub>10</sub> /ml. Iz rezultatov je razvidno, da je vsebnost Q<sub>10</sub> v mleku odvisna od vsebnosti maščobe.

Mattila in Kumpulainen (2001) sta ekstrahirala CoQ<sub>10</sub> iz mleka z 1,5 % maščobe in določila le 0,1 µg ubikinona/g mleka. Nižji rezultat je verjetno posledica drugačnega

postopka ekstrakcije saj nista uporabila 10 % perklorne kisline za denaturacijo beljakovin, poleg tega pa sta uporabila drugačno topilo za ekstrakcijo.

Iz preglednice 8, ki prikazuje izkoristek ekstrakcije CoQ<sub>10</sub> iz mleka s 3,5 % maščobe, s standardnim dodatkom CoQ<sub>10</sub> vidimo, da se z uporabo LLE metode rezultati gibljejo od 84,6 % – 88,7 % (povprečna vrednost je 87,4 %) in so vsi v območju postavljenega kriterija za točnost metode (100±20 %).

Preglednice 15, 16, 17 in 18 podajajo rezultate ekstrakcije CoQ<sub>10</sub> iz kefirja, kislega mleka, LCA probiotičnega in sadnega jogurta, Količina CoQ<sub>10</sub> variira od vzorca do vzorca. Tudi tukaj je očitna korelacija med ubikinonom in maščobami, saj smo dobili največjo vsebnost ubikinona v kefirju, ki ima 3,5 % maščob. Manjša kot je vsebnost maščob v izdelku, manjša je tudi vsebnost ubikinona, kot posledica topnosti CoQ<sub>10</sub> v maščobah.

Weber in sod. (1997) so v jogurtu s 3,2 % maščob, določili koncentracijo 1,2 µg CoQ<sub>10</sub>/g. Vzorcem (1 – 4 g) so dodajali 0,9 % raztopino NaCl in CoQ<sub>10</sub> ekstrahirali 3x z mešanico etanol:heksan 1:5. Ekstrakt so spirali s raztopino NaCl in osušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Topilo so uparili, ostanek pa raztopili v heksanu. Mattila in Kumpulainen (2001) sta, po že prej opisanem postopku, določila v jogurtu s 3,5 % maščob 2,4 µg CoQ<sub>10</sub>/g. Uporaba različne metode ekstrakcije pomembno vpliva na dobljene rezultate, prav tako pa tudi vrsto drugih dejavnikov, kot na primer vzorec in njegova primarna vsebnost CoQ<sub>10</sub>.

Glede na višjo vsebnost maščobe, ki jo je vseboval njihov vzorec jogurta, lahko rečem, da so naši rezultati primerljivi z njihovimi (v jogurtu z 1,5 % maščobe smo določili vsebnost 0,70 µg CoQ<sub>10</sub>/ml, kar je približno polovico manj, kot so ga določili Weber in sod. v jogurtu s skoraj še enkrat večjim odstotkom maščobe).

Povprečni izkoristek ekstrakcije iz mleka s 3,5 % maščobe, s standardnim dodatkom CoQ<sub>10</sub>, z uporabo SPE metode, je bil nizek, rezultati se gibljejo od 14 % – 17 % (povprečna vrednost je 15,9 %), kar je glede na postavljen kriterij za točnost metode neustrezno. Preizkusili smo različne adsorbente, topila za ekstrakcijo in spiranje, vendar so bili izkoristki še slabši.

V nadaljevanju smo dodajali različne sledeče koncentracije koencima Q<sub>10</sub>: 1 %, 50 %, 100 % in 150 % glede na koncentracijo delovnega standarda, vendar v nobenem primeru izkoristki niso bili višji od 17 % in jih v nalogi ne podajamo. Zaradi slabih rezultatov že pri alpskem mleku s 3,5 % maščobe, ostalih vzorcev mleka po tem postopku nismo pripravili. Ekstrakcijo je oteževala konsistenca izdelkov, to pa je vplivalo na same rezultate. Ravno zaradi tega je izjemno pomembno, da uporabljamo majhne količine vzorcev ali pa, da se poslužujemo posebnih postopkov priprave vzorca, kot je na primer saponifikacija. Zaradi pregoste konsistence vzorcev, kljub razredčitvi z 20 % vodno metanolno raztopino (voda:metanol, = 20:80, (v/v)), ekstrakcije koencima Q<sub>10</sub> iz mlečnih izdelkov po postopku SPE, ni bilo mogoče izvesti, zato smo SPE postopek ekstrakcije opustili in nadaljevali analize le z LLE postopkom.

### 5.1.2 Validacija metode

Metodo smo validirali po validacijskem protokolu. Povzetek preiskovanih parametrov, njihovi kriteriji in rezultati so podani v preglednici 27.

Ustreznost sistema smo dnevno določili z SST testom, kjer smo preverjali ponovljivost injiciranja (RSD = relativni standardni odklon), število teoretskih podov (N) in obliko kromatografskega vrha (T). Vse dobljene vrednosti so bile vsak dan v mejah zahtevanih kriterijev, s čimer smo potrdili ustreznost sistema HPLC za delo (preglednica 10).

Natančnost metode smo testirali na mleku s 3,5 % maščobe. Vsebnost CoQ<sub>10</sub> je variirala od 3,55 mg/l – 3,98 mg/l mleka (preglednica 11). Povprečna vsebnost je bila 3,71 mg/l. Vse meritve so bile znotraj intervala zaupanja pri 95 % zanesljivosti. Glede na kriterij natančnosti metode (RSD ≤ 5,0 %) smo ugotovili, da je metoda dovolj natančna za določanje CoQ<sub>10</sub> v mleku s 3,5 % maščobe saj smo dobili RSD = 4,09 % (preglednica 11).

Točnost metode smo preverjali tako z mlekom kot tudi z mlečnimi izdelki, v območju od QL 1 % do 150 % (oz. od 0,5 µg/ml do 75 µg/ml) glede na koncentracijo CoQ<sub>10</sub> v standardni raztopini. Izkoristki ekstrakcije CoQ<sub>10</sub> s standardnim dodatkom so bili pri mleku s 3,5 % maščobe v območju od 84,6 % - 103,4 % , pri mleku z 1,6 % maščobe v območju od 85,9 % - 102,8 % ter pri mleku z 0,5 % maščobe v območju od 85,6 % - 100,3 %

(preglednice 12, 13 in 14). Vse meritve so bile znotraj intervala zaupanja pri 95 % zanesljivosti. Glede na kriterij za točnost ( $100,0 \pm 20,0$  %) za koencim Q<sub>10</sub> v območju od QL 1 % do 150 % (oz. od 0,5 µg/ml do 75 µg/ml) glede na koncentracijo CoQ<sub>10</sub> v standardni raztopini, smo ugotovili, da je uporabljena HPLC metoda dovolj točna za določanje CoQ<sub>10</sub>.

Ostalim mlečnim izdelkom smo dodajali le 100 % standardni dodatek in dobili rezultate izkoristka znotraj intervala zaupanja in sicer v območju od 95,4 % - 100,7 % (preglednica 20). Rezultati so precej manj variirali pri kislem mleku in jogurtih, kot pri kefirju. Glede na kriterij za točnost ( $100,0 \pm 20,0$  %) in ponovljivost ( $RSD \leq 10,0$  %) za koencim Q<sub>10</sub> v območju od QL 1 % do 150 % (oz. od 0,5 µg/ml do 75 µg/ml) ter glede na koncentracijo CoQ<sub>10</sub> v standardni raztopini, smo ugotovili, da je metoda dovolj točna za določanje CoQ<sub>10</sub> tudi v različnih mlečnih izdelkih.

Iz preglednice 21, 22, 23 in 24 ugotavljamo, da smo glede na toleranco razmerja pri limiti kvantizacije ( $100,0 \pm 20,0$  %) in ponovljivosti ( $RSD \leq 10,0$  %) potrdili točko QL za določanje CoQ<sub>10</sub> v mleku in mlečnih izdelkih.

Iz kromatogramov topila in mobilne faze je razvidno, da na mestu kromatografskega vrha koencima Q<sub>10</sub> ni vrhov, ki bi motili določanje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub>, Retencijski čas koencima v analiziranem vzorcu mleka se ujema z retencijskim časom koencima v raztopini standarda. Iz kromatogramov vzorcev vidimo, da je največ koencima Q<sub>10</sub> pri mleku s 3,5 % maščobe, oziroma ga pri mleku z 0,5 % mlečne maščobe sploh ni. Večji kromatografski vrh koencima Q<sub>10</sub> smo zaznali pri mleku z več maščobe, kar smo glede na topnost Q<sub>10</sub> v maščobah tudi pričakovali. Glede na kriterije za selektivnost (kromatogrami topila in mobilne faze ne vsebujejo nobenih spojin, ki bi motile elucijo aktivne komponente CoQ<sub>10</sub> v mleku in mlečnih izdelkih) smo ugotovili, da je metoda selektivna za določanje in identifikacijo koencima Q<sub>10</sub> v vzorcih mleka in mlečnih izdelkov.

Dokazali smo stabilnost standardnih raztopin, hranjenih pri sobni temperaturi in v hladilniku od 0 do 48 h, medtem ko raztopine vzorcev niso bile stabilne niti 12 h, pojavilo se je kosmičenje.



## 5.2 SKLEPI

- Z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE) nismo dosegli zadovoljivih rezultatov. Izkoristki ekstrakcije so bili znatno nižji, kot pri LLE postopku, kjer smo dosegli zadovoljive rezultate, zato je bila ekstrakcija v tekočo fazo - LLE, v našem primeru, učinkovitejša in zato bolj ustrezna. S tem je bila naša hipoteza ovržena.
- Izbrano metodo ekstrakcije CoQ<sub>10</sub> iz mleka in mlečnih izdelkov smo optimizirali in določili optimalne kromatografske pogoje HPLC ločbe ter validirali izbrani postopek.
- Z optimalnimi pogoji ločbe HPLC sistema smo dosegli, da na mestu elucije koencima Q<sub>10</sub> v uporabljenih reagentih, topilu in mobilni fazi ni bilo spojin, ki bi motile določanje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub>.
- Večji odziv koencima Q<sub>10</sub> smo zaznali pri mleku z več maščobe, kar smo glede na topnost koencima Q<sub>10</sub> v maščobah, tudi pričakovali.
- Z validacijo metode smo ugotovili, da je metoda dovolj natančna in točna glede na zahtevane kriterije, ter selektivna za določanje in identifikacijo koencima Q<sub>10</sub> v mleku in mlečnih izdelkih.

## 6 POVZETEK

V diplomskem delu smo želeli razviti optimalen postopek za določanje vsebnosti CoQ<sub>10</sub> v mleku in mlečnih izdelkih. Pripravili smo ga z izbiro ustrežnejšega postopka ekstrakcije CoQ<sub>10</sub> iz mleka in mlečnih izdelkov, z določitvijo optimalnih pogojev HPLC ločbe ter z validacijo izbranega postopka.

Pričakovali smo, da bo ekstrakcija CoQ<sub>10</sub> iz mleka in mlečnih izdelkov ob uporabi SPE (ekstrakcija na trdni fazi) metode učinkovitejša, oziroma nam bo dala boljši izkoristek in da bo tudi časovno primernejša kot LLE (ekstrakcija tekoče-tekoče).

Z ekstrakcijo na trdni fazi nismo dosegli zadovoljivih rezultatov. Izkoristki ekstrakcije so bili znatno nižji (povprečno 15,9 %), kot pri LLE postopku, kjer smo dosegli zadovoljive rezultate (povprečno 87,4 %), zato je bila ekstrakcija v tekočo fazo - LLE v našem primeru bolj ustrezna in smo se je vedno posluževali.

Pri izbranih pogojih delovanja HPLC sistema smo ugotovili, da na mestu elucije koencima Q<sub>10</sub> v uporabljenih reagentih, topilu in mobilni fazi ni spojin, ki bi motile določanje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub>. Retencijski čas koencima v analiziranem vzorcu mleka se je ujema z retencijskim časom koencima v raztopini standarda. Večji kromatografski vrh koencima Q<sub>10</sub> smo zaznali pri bolj mastnem mleku, kar smo tudi pričakovali, glede na topnost koencima Q<sub>10</sub> v maščobah. Glede na dobljene rezultate o vsebnosti CoQ<sub>10</sub> v mleku ugotavljamo, da so te nizke (od 0,46 do 3,2 µg/ml). Tako bi lahko šele z 10 L mleka pokrili priporočene dnevne količine (30 mg). Mleko je primeren medij za dodajanje CoQ<sub>10</sub>, zato je smislen razvoj mlečnih izdelkov, obogatenih s tem antioksidantom.

Ugotovili smo, da je metoda selektivna za določanje in identifikacijo koencima Q<sub>10</sub> v vzorcih mleka in mlečnih izdelkih. Metoda je natančna znotraj dneva (RSD = 4,09 %) glede na kriterij (RSD = 5,0 %).

Glede na kriterij za točnost ( $100,0 \pm 20,0$ ) smo prav tako potrdili, da je metoda dovolj točna, saj so bile naše vrednosti vse v območju od 86,6 % do 102,3 %, tako za mleko kot za mlečne izdelke.

Dokazali smo stabilnost standardnih raztopin, hranjenih pri sobni temperaturi in v hladilniku od 0 do 48 h, medtem ko raztopine vzorcev niso bile stabilne niti 12 h, pojavilo se je kosmičenje.

Glede na rezultate validacije, metoda izpolnjuje vse pogoje za določanje koencima Q<sub>10</sub> v mleku in mlečnih izdelkih.

## 7 VIRI

- Boyer R. 2002. Concepts in biochemistry. 2<sup>nd</sup> ed. New York, John Wiley & Sons: 456-456
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 460-460
- Bracco U., Loliger J., Saucy F. 1989. Protection d' un produit alimentaire, cosmetique ou pharmaceutique de l' oxidation. European Patent Office 90118535.5: 8 str.
- Chamberlain J. 1985. Analysis of drugs in biological fluids. Boca Raton, CRC Press: 219 str.
- Ernster L. 1977. Facts and ideas about the function of coenzyme Q<sub>10</sub> in the mitochondria. V: Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q. Vol.1. Yamamura Y., Folkers K., Ito Y. (eds). Amsterdam, Elsevier: 15-18
- Ernster L., Dallner G. 1995. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. Biochimica et Biophysica Acta, 1271: 195-204
- Kamei M., Fujita T., Kanabe T., Sasaki K., Oshiba K., Otani S., Matsui-Yuasa I., Morisawa S. 1986. The distribution and content of ubiquinone in foods. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 56: 57-63
- Krishnan T.R., Ibrahim I. 1994. Solid phase extraction technique for the analysis of biological samples. Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis, 3,12: 287-294
- Kobe J., Pollak A. 1970. Navodila za praktikum iz organske kemije. Ljubljana, Fakulteta za naravoslovje in tehnologijo, Laboratorij za organsko kemijo: 66-67
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-20

Langsjoen P. H. 1994. Introduction to coenzyme Q<sub>10</sub>. Texas, University of Texas Medical Branch at Galvestone

<http://faculty.washington.edu/ely/coenzq10.html> (maj 2007): 20 str.

Littarru G. P., Tiano L. 2005. Clinical aspects of coenzyme Q<sub>10</sub>. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 8: 641-646

Louter A. J. H., Bosma E., Schipperen J. C. A., Vreuls J. J., Brinkman U. A. T. 1997. Automated on-line solid-phase extraction gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection: Determination of benzodiazepines in human plasma. Journal of Chromatography B, 689: 35-43

Mattila P., Kumpulainen J. 2001. Coenzymes Q<sub>9</sub> and Q<sub>10</sub>: Contents in foods and dietary intake. Journal of Food Composition and Analysis, 14: 409-417

Mavrin D., Oštir Š. 2002. Tehnologija mleka in mlečnih izdelkov. 1. izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 218 str.

Matissek R., Wittkowski R. 1992. High performance liquid chromatography in food control and research. 1<sup>st</sup> ed. Hamburg, Behr's Verlag GmbH & Co.: 347 str.

Mitchell P. 1991. The vital protonmotive role of coenzyme Q. V: Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q. Vol. 6. Folkers K., Yamagami Y., Littarru G. P. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 3-10

Pavlin R. 1997. Ubikinon (koencim Q<sub>10</sub>). Zdravstveni vestnik, 66: 137-140

Phenomenex. 2001. SPE Reference manual & users guide. Kranj, Kemomed:1-5

Pravilnik o kakovosti mleka, mlečnih izdelkov, siril in čistih cepiv. 1993. Uradni list Republike Slovenije, 13, 21: 1069-1073

Prošek M., Golc Wondra A. 1997. Validacija analiznih metod v tenkoplastni in tekočinski kromatografiji. Ljubljana, Kemijski inštitut: 173-214

Prošek M. 1996. Validacija separacijskih metod. Interno gradivo. Ljubljana, Kemijski inštitut: 23-33

Rudan-Tasič D. 2000. Vitamin C, vitamin E in koencim Q<sub>10</sub>. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 39-50

Simpson N. J. K., Van Horne K. C. 1985. The handbook of sorbent extraction technology. Harbor City, Analytichem International,: 45-45

Stocker R. 2002. Possible health benefits of coenzyme Q<sub>10</sub>. Sydney, University of New South Walles

<http://lpi.oregonstate.edu/f-w02/coenzymeq10.html> (maj 2007): 2 str.

Weber C., Bysted A., Holmer G. 1997. Coenzyme Q<sub>10</sub> in the diet-daily intake and relative bioavailabilitly. Journal of Molecular Aspects of Medicine, 18: 251-254