

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mateja LUŠNIC

**RAZVOJ ANALITSKE METODE ZA DOLOČANJE KOENCIMA Q<sub>10</sub>  
V MAŠČOBNO BOGATIH TKIVIH PIŠČANCEV**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD FOR  
DETERMINATION OF COENZYME Q<sub>10</sub> IN FAT RICH CHICKEN  
TISSUES**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Praktični del je bil opravljen na Katedri za tehnologijo mesa in gotovih jedi Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Priprava vodotopne oblike koencima Q<sub>10</sub> je potekala v Laboratoriju za prehrambeno kemijo Kemijskega inštituta v Ljubljani.

Študijska komisija oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Leo Gašperlin, za somentorja dr. Tomaža Polaka in za recenzenta doc. dr. Blaža Cigića.

Mentorica: doc. dr. Lea Gašperlin

Somentor: dr. Tomaž Polak

Recenzent: doc. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mateja Lušnic

**-KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

ŠD	Dn
DK	UDK 543.544.05.062: 577.161.6: 637.54'65 (043) = 163.6
KG	koencimi/koencim Q <sub>10</sub> /analitske metode/validacija metod/maščobno tkivo piščancev/krma obogatena s koencimom Q <sub>10</sub> /maščobne kisline/holesterol
AV	LUŠNIC, Mateja
SA	GAŠPERLIN, Lea (mentorica)/POLAK, Tomaž (somentor)/CIGIĆ, Blaž (recenzent)
KZ	SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2008
IN	RAZVOJ ANALITSKE METODE ZA DOLOČANJE KOENCIMA Q <sub>10</sub> V MAŠČOBNO BOGATIH TKIVIH PIŠČANCEV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 76 str., 13 pregl., 44 sl., 76 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen diplomskega dela je bil ugotoviti vpliv dodanega koencima Q <sub>10</sub> v krmo piščancev na njegovo vsebnost v koži in abdominalni maščobi. Preveriti smo žeeli tudi morebitne spremembe v maščobnokislinski sestavi in vsebnosti holesterola. V poizkus je bilo vključenih 200 piščancev provenience Ross 308, starih 41 dni. Poskusne skupine so bile oblikovane glede na dolžino krmljenja piščancev z vodotopno obliko koencima Q <sub>10</sub> (0 dni, 10 dni, 20 dni, 30 dni in 40 dni). Znane metode za določanje vsebnosti koencima Q <sub>10</sub> v mišičnini niso bile primerne za maščobno bogata tkiva, kot sta piščančja koža in maščoba. Razvili in validirali smo primernejšo analitsko metodo. Ključna faza pri razvoju je bila odstranitev maščobe iz vzorca. Izvedli smo ekstrakcijo s trdno fazo (SPE) in uporabili kolono Supelclean™ ENVI™ Florisil®. V koži smo določili značilno večjo vsebnost koencima Q <sub>10</sub> kot v maščobi. V nasprotu s pričakovanji je dodatek koencima Q <sub>10</sub> v krmo privadel do zmanjšanja njegove vsebnosti tako v koži kot v maščobi. Dodatek koencima Q <sub>10</sub> v krmo značilno vpliva na maščobnokislinsko sestavo piščančje kože in maščobe. Vsebnost holesterola v koži in maščobi se je zmanjšala sorazmerno z dolžino krmljenja piščancev s koencimom Q <sub>10</sub> .

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN Dn  
DC UDK 543.544.05.062: 577.161.6: 637.54'65 (043) = 163.6  
CX coenzymes/coenzyme Q<sub>10</sub>/analytical methods/validation of an analytical methods/chicken fat tissue/coenzyme Q<sub>10</sub> riched feed/fatty acids/cholesterol  
AU LUŠNIC, Mateja  
AA GAŠPERLIN, Lea (supervisor)/POLAK, Tomaž (co-advisor)/CIGIĆ, Blaž (reviewer)  
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2008  
TI DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF COENZYME Q<sub>10</sub> IN FAT RICH CHICKEN TISSUES  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO XII, 76 p., 13 tab., 44 fig., 76 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The aim of this study was to investigate the influence of coenzyme Q<sub>10</sub> addition to the chicken feed and its content in the skin tissue and abdominal fat. Also the potential changes in fatty acids' composition and cholesterol content were investigated. There were 200 chicken of Ross 308 provenience, 41 days old, included in the experiment. The division into the test groups was established according to the duration of feeding with the water soluble form of coenzyme Q<sub>10</sub> (0 days, 10 days, 20 days, 30 days and 40 days). The known methods for coenzyme Q<sub>10</sub> determination in musculature were not appropriate for its determination in fat rich tissues such as chicken skin and fat. A more appropriate analytical method was developed and validated. The separation of the fat from the bulk of the sample was the key step in method development. For the separation, the solid phase extraction (SPE) was conducted on the Supelclean™ ENVI™ Florisil® cartridge. Significantly higher coenzyme Q<sub>10</sub> content was found in the skin tissue compared to the fat. On contrary to expectations, the coenzyme Q<sub>10</sub> addition into the feed lead to a decrease in its content in the skin as well as in fat tissue. The coenzyme Q<sub>10</sub> addition significantly affects the fatty acids' composition of the chicken's skin and fat tissue. The cholesterol content in the skin and fat tissue decreases proportionally to the duration of chicken's feeding with coenzyme Q<sub>10</sub>.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN .....	2
1.2 HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>3</b>
2.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI KOENCIMA Q.....	3
<b>2.1.1 Koencim Q<sub>10</sub> .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Pomen koencima Q<sub>10</sub> .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.3 Odkritje koencima Q .....</b>	<b>4</b>
2.2 VLOGA KOENCIMA Q <sub>10</sub> V MITOHONDRSKI TRANSPORTNI VERIGI ELEKTRONOV.....	6
<b>2.2.1 Kompleks I: NADH ubikinon oksidoreduktaza ali krajše NADH dehidrogenaza .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.2 Kompleks II: sukcinat ubikinon oksidoreduktaza ali krajše sukcinat dehidrogenaza .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.3 Kompleks III: citokrom c reduktaza .....</b>	<b>8</b>
<b>2.2.4 Kompleks IV: citokrom c oksidaza .....</b>	<b>9</b>
2.3 KOENCIM Q <sub>10</sub> KOT ANTIOKSIDANT .....	9
<b>2.3.1 Antioksidativna vloga koencima Q<sub>10</sub> v procesu oksidacije lipidov .....</b>	<b>10</b>
<b>2.3.2 Antioksidativna vloga koencima Q<sub>10</sub> v plazmi.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.3 Koencim Q<sub>10</sub> kot prooksidant .....</b>	<b>12</b>
2.4 SKUPNE BIOSINTEZNE POTI KOENCIMA Q <sub>10</sub> IN HOLESTEROLA .....	13
<b>2.4.1 Biosinteza koencima Q<sub>10</sub>.....</b>	<b>13</b>
<b>2.4.2 Biosinteza holesterola .....</b>	<b>13</b>
<b>2.4.3 Pomen encima HMG-CoA reduktaze .....</b>	<b>15</b>
<b>2.4.4 Vpliv statinov na biosintezo holesterola in koencima Q<sub>10</sub> .....</b>	<b>16</b>
<b>2.4.5 Vpliv fenilketonurije in mevalonske acidurije na biosintezo koencima Q<sub>10</sub> in holesterola .....</b>	<b>16</b>

2.5	VLOGA KOENCIMA Q <sub>10</sub> IN HOLESTEROLA V CELIČNIH MEMBRANAH .....	17
2.6	PORAZDELITEV KOENCIMA Q <sub>10</sub> V TELESU .....	17
2.7	POMANJKANJE KOENCIMA Q <sub>10</sub> .....	18
2.8	KOENCIM Q <sub>10</sub> KOT PREHRANSKI DODATEK .....	19
<b>2.8.1</b>	<b>Izboljšanje biološke razpoložljivosti koencima Q<sub>10</sub> .....</b>	<b>20</b>
2.9	METODE DOLOČANJA KOENCIMA Q <sub>10</sub> V RAZLIČNIH TKIVIH .....	21
<b>2.9.1</b>	<b>Ekstrakcija s trdno fazo (SPE) .....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE DELA .....</b>	<b>25</b>
3.1	MATERIAL IN NAČRT POIZKUSA.....	25
<b>3.1.1</b>	<b>Priprava krme.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Preparat.....</b>	<b>25</b>
3.2	METODE .....	26
<b>3.2.1</b>	<b>Določanje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v koži in maščobi .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Določanje vsebnosti holesterola.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Določanje maščobnokislinske sestave kože in maščobe.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Statistična analiza .....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>35</b>
4.1	RAZVOJ ANALITSKE METODE .....	35
<b>4.1.1</b>	<b>Začetna metoda Kemijoškega inštituta .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Različne poti razvoja nove metode.....</b>	<b>37</b>
4.2	VALIDACIJA ANALITSKE METODE .....	41
<b>4.2.1</b>	<b>Selektivnost.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Ponovljivost .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Linearnost .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Izkoristki metode .....</b>	<b>47</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Meje detekcije in kvantifikacije .....</b>	<b>48</b>
4.3	APLIKACIJA ANALITSKE METODE .....	49
<b>4.3.1</b>	<b>Povprečne vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v koži in maščobi .....</b>	<b>49</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Povprečne vsebnosti maščobnih kislin in holesterola v maščobi .....</b>	<b>49</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Povprečne vsebnosti maščobnih kislin in holesterola v koži.....</b>	<b>51</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Vpliv dodanega Q<sub>10</sub> na njegovo vsebnost v piščančji koži in maščobi .....</b>	<b>53</b>
<b>4.3.5</b>	<b>Vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo na maščobnokislinsko sestavo piščanče kože in maščobe.....</b>	<b>55</b>
<b>4.3.6</b>	<b>Vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo na vsebnost holesterola v piščančji koži in maščobi.....</b>	<b>65</b>

<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>	<b>66</b>
5.1 RAZPRAVA .....	66
5.2 SKLEPI .....	70
<b>6 POVZETEK .....</b>	<b>71</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>72</b>

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Delež reducirane oblike koencima Q <sub>10</sub> v človeških tkivih (Aberg in sod., 1992; Ruiz-Jimenez in sod., 2007) .....	10
Preglednica 2: Vsebnost koencima Q <sub>10</sub> v človeških tkivih (Aberg in sod., 1992; Ruiz-Jimenez in sod., 2007) .....	18
Preglednica 3: Kemijska sestava florisila (Silica Company, 2008).....	24
Preglednica 4: Razporeditev piščancev provenience Ross 308 po skupinah. ....	25
Preglednica 5: Postopek in rezultati uporabe različnih homogenizacijskih in ekstrakcijskih topil.....	37
Preglednica 6: Ponovljivost znotraj in med paralelkami za kožo in maščobo (µg/g). ....	44
Preglednica 7: Meje detekcije pri določevanju vsebnosti koencima Q <sub>10</sub> (pg nanosa na kolono pri injiciraju 15 µl). .....	48
Preglednica 8: Rezultati določanja vsebnosti Q <sub>10</sub> (µg/g) v piščančji koži in maščobi z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.....	49
Preglednica 9: Rezultati določanja maščobnokislinske sestave (ut. % od skupnih MK) in holesterola (mg/100g) v piščančji maščobi z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri. ....	50
Preglednica 10: Rezultati določanja maščobnokislinske sestave (ut. % od skupnih MK) in holesterola (mg/100 g) v piščančji koži z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.....	52
Preglednica 11: Vpliv dodanega koencima Q <sub>10</sub> v krmo piščancev na njegovo vsebnost (µg/g) v piščančji koži in maščobi (Duncanov test, $\alpha = 0,05$ ).....	53
Preglednica 12: Vpliv dodanega koencima Q <sub>10</sub> v krmo piščancev in vrste tkiva na vsebnost holesterola (mg/100 g) in maščobnokislinsko sestavo (ut. % od skupnih MK) v piščančji maščobi in koži ( $n = 6$ , Duncanov test, $\alpha = 0,05$ ). ....	55
Preglednica 13: Maščobnokislinska sestava piščanče kože in maščobe; primerjava dobljenih rezultatov z literurnimi. ....	68

**KAZALO SLIK**

Slika 1:	Struktura formula koencima Q <sub>10</sub> (Littarlu in Langsjoen, 2007).....	3
Slika 2:	Redoks oblike koencima Q <sub>10</sub> (Garrett in Grisham, 2002) .....	4
Slika 3:	Transportna veriga elektronov – shematski prikaz na notranji membrani mitohondrija (Nelson in Cox, 2005).....	6
Slika 4:	Kompleks I: shematski prikaz delovanja NADH dehidrogenaze (Nelson in Cox, 2005). ....	7
Slika 5:	Kompleks II: shematski prikaz delovanja sukcinat dehidrogenaze (Garrett in Grisham, 2002) .....	7
Slika 6:	Kompleks III: shematski prikaz delovanja citokrom c reduktaze (Nelson in Cox, 2005). ....	8
Slika 7:	Kompleks IV: shematski prikaz delovanja citokrom c oksidaze (Nelson in Cox, 2005). ....	9
Slika 8:	Proces oksidacije lipidov (Gunstone, 1996). ....	11
Slika 9:	Shema lipoproteina Apo B100 z lepo vidnim položajem antioksidantov (CoQ <sub>10</sub> ) (Littarlu in Langsjoen, 2007).....	12
Slika 10:	Shematski prikaz biosintezne poti koencima Q in holesterola (Shinde in sod., 2005) ...	14
Slika 11:	Shematski prikaz biosintezne poti mevalonata (Garrett in Grisham, 2002). ....	15
Slika 12:	Vpliv statinov na HMG-CoA reduktazo (Marcoff in Thompson, 2007). ....	16
Slika 13:	Shematski prikaz položaja holesterola in koencima Q <sub>10</sub> (CoQ <sub>10</sub> ) v citoplazemski membrani (Nelson in Cox, 2005).....	17
Slika 14:	Absorpcija in distribucija različnih oblik koencima Q <sub>10</sub> (Hosoe in sod., 2007). ....	19
Slika 15:	Shematski prikaz delovanja SPE (Phenomenex, 2008). ....	23
Slika 16:	Shema kompleksa β-ciklodekstrina in koencima Q <sub>10</sub> (CoQ <sub>10</sub> -βCD) (Prošek in sod., 2004). ....	26
Slika 17:	Umeritvena krivulja za holesterol v koži in maščobi.....	32
Slika 18:	Kromatogram vzorca kože pripravljenega po metodi (poglavlje 4.1.1) brez SPE.....	36
Slika 19:	Kromatogram vzorca srca pripravljenega po metodi (poglavlje 4.1.1) brez SPE.....	36
Slika 20:	Kromatogram vzorca kože pripravljenega po metodi, opisani v poglavju 4.1.2.1. ....	39
Slika 21:	Kromatogram vzorca kože pripravljenega po metodi, opisani v poglavju 3.2.1. ....	40
Slika 22:	Preverjanje signalov: A – signal mobilne faze; B – signal reagentov brez vzorca (kromatografski pogoji opisani v poglavju 3.2.1.1).....	41
Slika 23:	Signal standardnega dodatka koencima Q <sub>10</sub> (kromatografski pogoji opisani v poglavju 3.2.1.1). ....	42

Slika 24: Primerjava kromatogramov vzorca kože: A – vzorec kože s standardnim dodatkom koencima Q <sub>10</sub> ; B – vzorec kože (kromatografski pogoji opisani v poglavju 3.2.1.1).....	42
Slika 25: Primerjava kromatogramov vzorca maščobe: A – vzorec maščobe s standardnim dodatkom koencima Q <sub>10</sub> ; B – vzorec maščobe (kromatografski pogoji opisani v poglavju 3.2.1.1).....	43
Slika 26: Umeritvena krivulja 1 – linearnost instrumenta (LC-MS) za koencim Q <sub>10</sub> .....	44
Slika 27: Umeritvena krivulja 2 – linearnost vpliva matriksa kože na signal koencima Q <sub>10</sub> .....	45
Slika 28: Umeritvena krivulja 3 – linearnost vpliva postopka in matriksa kože na signal koencima Q <sub>10</sub> .....	45
Slika 29: Umeritvena krivulja 2 – linearnost vpliva matriksa maščobe na signal koencima Q <sub>10</sub> ....	46
Slika 30: Umeritvena krivulja 3 – linearnost vpliva postopka in matriksa maščobe na signal koencima Q <sub>10</sub> .....	46
Slika 31: Umeritvene krivulje za kožo: UM1-umeritvena 1, UM2-umeritvena 2 in UM3-umeritvena 3 (poglavlje 3.2.1.2).....	47
Slika 32: Umeritvene krivulje za maščobo: UM1-umeritvena 1, UM2-umeritvena 2 in UM3-umeritvena 3 (poglavlje 3.2.1.2).....	47
Slika 33: Vpliv dodanega koencima Q <sub>10</sub> v krmo na njegovo vsebnost v piščančji koži in maščobi.....	54
Slika 34: Vpliv dodanega koencima Q <sub>10</sub> v krmo na vsebnost nasičenih maščobnih kislin (NMK). ....	58
Slika 35: Vpliv dodanega koencima Q <sub>10</sub> v krmo na vsebnost palmitinske kisline (C16:0).....	58
Slika 36: Vpliv dodanega koencima Q <sub>10</sub> v krmo na vsebnost stearinske kisline (C18:0) .....	59
Slika 37: Vpliv dodanega koencima Q <sub>10</sub> v krmo na vsebnost ENMK. ....	60
Slika 38: Vpliv dodanega koencima Q <sub>10</sub> v krmo na vsebnost oleinske kisline (C18:1c-9).....	60
Slika 39: Vpliv dodanega koencima Q <sub>10</sub> v krmo na vsebnost VNMK.....	61
Slika 40: Vpliv dodanega koencima Q <sub>10</sub> v krmo na razmerje P/S.....	63
Slika 41: Vpliv dodanega koencima Q <sub>10</sub> v krmo na razmerje n-6/n-3. ....	63
Slika 42: Vpliv dodanega koencima Q <sub>10</sub> v krmo na vrednost IA. ....	64
Slika 43: Vpliv dodanega koencima Q <sub>10</sub> v krmo na vsebnost holesterola.....	65
Slika 44: Relativne spremembe v vsebnosti posameznih MK po različno dolgem krmljenju s koencimom Q <sub>10</sub> .....	69

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	– adenozintrifosfat
CD	– ciklodekstrin
CGT	– ciklodekstrin-glikoziltransferaza
CoQ <sub>10</sub>	– koencim Q <sub>10</sub> , ubikinon
CoQ <sub>10</sub> -MCC	– kompleks monokristalinične celuloze in koencima Q <sub>10</sub>
CoQ <sub>10</sub> -γ-CD	– kompleks γ-ciklodekstrina in koencima Q <sub>10</sub>
CoQ <sub>10</sub> -β-CD	– kompleks β-ciklodekstrina in koencima Q <sub>10</sub>
DHK	– dokozaheksaenojska kislina
DPK	– dokozapentaenojska kislina
ENMK	– enkrat nenasičene maščobne kisline
EPK	– eikozapentaenojska kislina
FADH <sub>2</sub>	– reducirani flavinadenindinukleotid
FA <sub>i</sub>	– konverzijski faktor
Fe-S	– železo-žveplovi kompleksi
FID	– plamensko ionizacijski detektor (Flame Ionisation Detector)
FMN	– flavinmononukleotid
FMNH <sub>2</sub>	– reducirani flavinmononukleotid
FPP	– farnezil pirofosfat
GC	– plinska kromatografija
GC-FID	– plinski kromatograf s plamensko ionizacijskim detektorjem
HDL	– lipoproteini velike gostote (high density lipoproteins)
HMG-CoA	– 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A
HPLC	– visokotlačna tekočinska kromatografija
IA	– indeks aterogenosti
KV	– koeficient variabilnosti
LC	– tekočinska kromatografija
LC-MS	– tekočinska kromatografija sklopljena z masnim spektrometrom
LDL	– lipoproteini majhne gostote (low density lipoproteins)
LLE	– ekstrakcija tekoče-tekoče
MEMK	– metilni ester maščobne kisline (FAME – Fatty Acid Methyl Ester)
MS	– masni spektrometer oz. masna spektrometrija
NADH	– nikotinamidadenindinukleotid
NMK	– nasičene maščobne kisline
P/S	– razmerje med vsoto vseh večkrat nenasičenih maščobnih kislin in vsoto nasičenih maščobnih kislin (Saturated/Polyunsaturated Fatty Acid)
Q	– ubikinon
QH <sup>•</sup>	– ubisemikinonski radikal (ubisemikinon)
QH <sub>2</sub>	– ubikinol
R <sup>2</sup>	– Pearsonov korelacijski koeficient

Rf	– faktor odzivnosti detektorja (Response factor)
ROO <sup>•</sup>	– maščobni peroksilni radikal
ROS	– reaktivne kisikove zvrsti
RP-HPLC	– reverzno fazna visokotlačna tekočinska kromatografija
SDS	– natrijev dodecil sulfat
so	– standardni odklon
SPE	– ekstrakcija s trdno fazo (solid phase extraction)
VLDL	– lipoproteini zelo majhne gostote (very low density lipoproteins)
VNMK	– večkrat nenasičene maščobne kisline

## 1 UVOD

Osnova zdravega načina življenja in eden izmed poglavitnih dejavnikov preprečevanja kroničnih bolezni, ki so danes vse pogostejši vzrok smrti, je zdrava prehrana. Današnji stil življenja in prehranjevanja nam povzroča težave pri skrbi za zdravo in uravnoteženo prehrano. Prav zaradi tega med potrošniki narašča povpraševanje po različnih prehranskih dopolnilih, ki bi na učinkovit in prijazen način prispevali k ohranjanju zdravja in krepitvi organizma. Zadnjih nekaj let eno od vlog vse bolj uspešno opravlja naravna substanca, imenovana koencim Q<sub>10</sub>.

Koencim Q ali ubikinon je naravna, vitaminom podobna spojina, prisotna v vsaki živi celici. Primarno se nahaja na notranji mitohondrijski membrani, kjer ima ključno vlogo pri prenosu elektronov v transportni verigi in tvorbi energije v obliki ATP v procesu oksidativne fosforilacije. Poznan je tudi kot močan maščobotopni antioksidant, ki ščiti celice pred poškodbami, nastalih zaradi delovanja prostih radikalov.

Raziskave po svetu kažejo, da koencim Q<sub>10</sub> povečuje odpornost organizma pred številnimi boleznimi, oziroma zavira njihovo nastajanje (bolezni srca in ožilja, nekatere vrste raka, imunske in vnetne bolezni, bolezni živčevja...). Njegovo delovanje je torej preventivno in lahko tudi zdravilno.

Koencim Q<sub>10</sub> lahko organizem proizvaja sam, vendar je dokazano, da začne z leti nivo endogenega (v telesu proizvedenega) koencima Q<sub>10</sub> precej hitro upadati. Največ koencima Q<sub>10</sub> je v organih, ki so oksidativno najbolj aktivni (npr. srčna mišica), prav v teh organih pa pride z leti do največjega zmanjšanja.

Različna živila praviloma vsebujejo nekaj koencima Q<sub>10</sub>, vendar so te količine ob normalnem prehranjevanju premajhne, da bi nadomestile starostno zmanjševanje endogenega koencima Q<sub>10</sub>. Za zadostne količine absorpcije bi bilo namreč potrebno zaužiti sorazmerno veliko maščobno bogate hrane, kar pa je v nasprotju s priporočili zdravega prehranjevanja. Zato se priporoča uživanje dodatnih količin koencima Q<sub>10</sub> v obliki različnih prehranskih dopolnil (kapsule, prašek).

Prehranska dopolnila pa niso pomembna le za starejše, temveč tudi za tiste, ki zaradi povišanja holesterola v krvi jemljejo statine, zdravila za znižanje ravni holesterola. Statini namreč zavirajo sintezo holesterola v organizmu, hkrati pa vplivajo tudi na sintezo koencima Q<sub>10</sub>. Raziskave so pokazale znižanje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v plazmi, medtem ko delovanje statinov na znižanje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v tkivih še ni povsem raziskano.

Zadnjih nekaj let je bilo posvečenih razvoju takšne oblike koencima Q<sub>10</sub>, ki bi omogočila njegovo dodajanje v zdravo, nizkomaščobno hrano. Številne raziskave na Kemijskem

inštitutu v Ljubljani so pripeljale do razvoja vodotopne oblike koencima Q<sub>10</sub>, edinstvenega vektorja za različne izdelke na vodni osnovi.

### 1.1 NAMEN

Diplomsko delo je bilo del večjega projekta proučevanja vpliva dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo piščancev. Namen diplomskega dela je bil ugotoviti vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo piščancev na njegovo vsebnost v koži in abdominalni maščobi. Prav tako smo želeli ugotoviti morebitne spremembe v maščobnokislinski sestavi in vsebnosti holesterola. V literaturi opisane metode za določanje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> so se v našem primeru izkazale za neprimerne. V diplomskem delu smo zato razvili novo, primernejšo metodo za določanje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v maščobno bogatih tkivih, kot sta koža in abdominalna maščoba.

### 1.2 HIPOTEZE

Predpostavili smo, da se bo z dodatkom koencima Q<sub>10</sub> v krmo piščancev njegova vsebnost v koži in abdominalni maščobi povečevala s časovnim zamikom. Pričakovali smo tudi vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> na vsebnost holesterola in maščobnokislinski profil v omenjenih tkivih.

## 2 PREGLED OBJAV

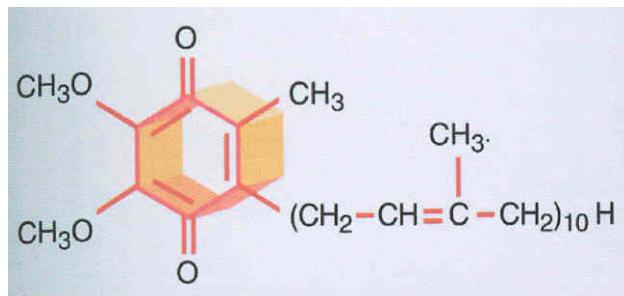
### 2.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI KOENCIMA Q

Koencim Q ali ubikinon je naravna spojina, sestavljena iz benzokinonskega obroča in lipidne stranske verige z različno dolgimi izoprenskimi enotami (6-10). Dolžina izoprenske verige je odvisna od vrste organizma, v katerem se koencim Q nahaja. Bakterije sintetizirajo ubikinon z osmimi (Q<sub>8</sub>), kvasovke ubikinon s šestimi (Q<sub>6</sub>), pri sesalcih pa prevladuje ubikinon z devetimi (Q<sub>9</sub>) in desetimi (Q<sub>10</sub>) izoprenskimi enotami; koencim Q<sub>9</sub> je omejen predvsem na glodalce, v manjših količinah poteka sinteza tudi pri človeku (2-7 %), kjer prevladuje koencim Q<sub>10</sub> (Navas in sod., 2007).

Številne raziskave so potrdile, da dolžina stranske verige koencima Q nima posebnega vpliva na njegove funkcije (Zhang in sod., 1996).

#### 2.1.1 Koencim Q<sub>10</sub>

Kemijsko ime koencima Q<sub>10</sub> je 2,3-dimetoksi-5-metil-6-dekaprenil-1,4-benzokinon. Koencim Q<sub>10</sub> so ga imenovali zaradi njegove biokemijske vloge v organizmu, kjer deluje kot koencim. Q je prva črka angleške besede Quinone, 10 pa pomeni število izoprenskih enot v stranski verigi (Boyer, 2005).



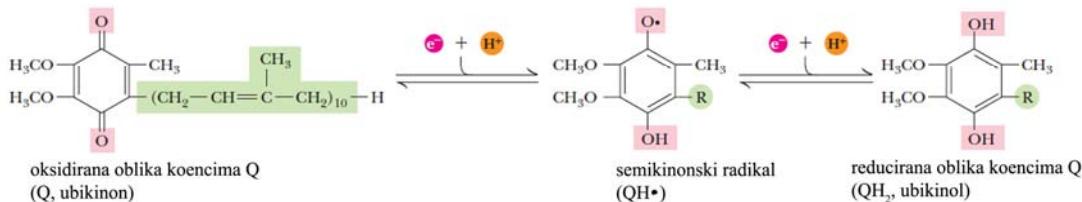
Slika 1: Strukturna formula koencima Q<sub>10</sub> (Littarru in Langsjoen, 2007).

Zaradi izredno hidrofobne narave je lahko koencim Q<sub>10</sub> prisoten le v treh fizičnih stanjih (Lenaz in sod., 2007):

- raztopljen v lipidnem dvosloju;
- vezan na proteine;
- v obliki micelarnih agregatov.

Za koencim Q<sub>10</sub> so značilne tri redoks oblike (Kozlov in sod., 1998):

- popolnoma oksidirana (ubikinon – Q);
- semikinonski radikal (ubisemikinon – QH<sup>•</sup>);
- popolnoma reducirana (ubikinol – QH<sub>2</sub>).



**Slika 2: Redoks oblike koencima Q<sub>10</sub> (Garrett in Grisham, 2002).**

### 2.1.2 Pomen koencima Q<sub>10</sub>

Koencim Q<sub>10</sub> ima pomembno vlogo pri transportu elektronov v mitohondrijski respiratorni verigi. Poznan je tudi kot edini maščobotopni antioksidant, ki ga telo lahko sintetizira (Crane in Navas, 1997). V organizmu deluje kot kofaktor za termogenin (Echtay in sod., 2000), regulira propustnost membran (Fontaine in sod., 1998), odgovoren je za stabilizacijo kompleksa III v mitohondrijski transportni verigi elektronov, pri sintezi pirimidinskih nukleotidov pa predstavlja naravni substrat za encime, nameščene v notranji membrani mitohondrijev (Santos-Ocana in sod., 2002). Koencim Q<sub>10</sub> vpliva tudi na povečanje preživelosti celic, tretiranih s kemoterapevtiki (Brea-Calvo in sod., 2006).

### 2.1.3 Odkritje koencima Q

Odkritje koencima Q sega v leto 1950 in je posledica dolgotrajnih raziskav mehanizmov in komponent, vključenih v biološko pretvorbo energije.

David Green je predpostavil, da naj bi bila procesa citratnega cikla in oksidativne fosforilacije povezana in organizirana v poseben kompleks. Pojavljati se je začelo vprašanje, kakšna je organiziranost encimov v teh procesih in kakšen je njihov vpliv na tvorbo energije v procesu oksidativne fosforilacije. V ta namen je Green skupaj z encimskim inštitutom univerze v Wisconsinu začel z raziskavami, katerih ključna točka je bila izolacija večjega števila mitohondrijev.

Mitohondriji so bili izolirani iz podganjih jeter, srčnih mišič golobov, največjo količino pa je predstavljala izolacija iz goveje srčne mišice. Srca so bila ustreznost homogenizirana, sledilo je centrifugiranje homogenata, ki je omogočilo ločitev mitohondrijev od neželenih komponent. Tako izolirane mitohondrije, ki so ostali v sedimentu v obliki rjave paste, so suspendirali v saharoznem fosfatnem pufru in jih ustreznost zmrznili do nadaljnjih analiz.

Dobra oskrba z mitohondriji je omogočila začetek raziskav, ki so se nanašale predvsem na transportno verigo elektronov. Iz vodnih sedimentov je bila možna izolacija flavoproteinov, sukcinat dehidrogenaze in nikotinamidadenindinukleotid dehidrogenaze

(NADH). Nadaljnje frakcioniranje je zahtevalo uporabo različnih detergentov. Sledila je separacija citokrom c reduktaze, ki vključuje citokrom b, citokrom c<sub>1</sub> in flavine. Z uporabo deoksiholata je bila omogočena tudi separacija citokrom c oksidaze, ki vključuje citokroma a in a<sub>3</sub>. Do odkritja koencima Q so te komponente predstavljale popolno transportno verigo elektronov.

Nadaljnje raziskave so bile namenjene vitaminom vpletenim v transportno verigo elektronov. Njihova izolacija iz mitohondrijev goveje srčne mišice je privedla do naključnega odkritja koencima Q. To, do tedaj neznano rumeno kristalinično snov, je prvič opazil Frederick Crane decembra 1956. Kasnejše ugotovitve so pokazale, da gre za kinon z absorpcijskim vrhom pri 275 nm, zato so ga poimenovali Q275. Pozneje so bile na kinonu odkrite še dve metilni skupini in izoprenske enote. Molekulska masa, določena z redoks titracijo reduciranega kinona, je znašala med 797 in 920. Nadaljnje študije so pokazale možnost oksidacije in redukcije kinona, kar je pripeljalo do zaključka, da bi ta spojina lahko bila pomemben člen v transportni verigi elektronov.

Karl Folkers je sprva menil, da gre za vitamin ter kinon začasno poimenoval koencim Q. Za potrditev njegove specifičnosti v transportni verigi, je s sodelavci sintetiziral vse možne kombinacije dimetoksi-benzokinonov. Po ekstrakciji koencima Q se je izkazalo, da lahko edino 2,3-dimetoksi kinon vpliva na sukcinoooksidazno aktivnost.

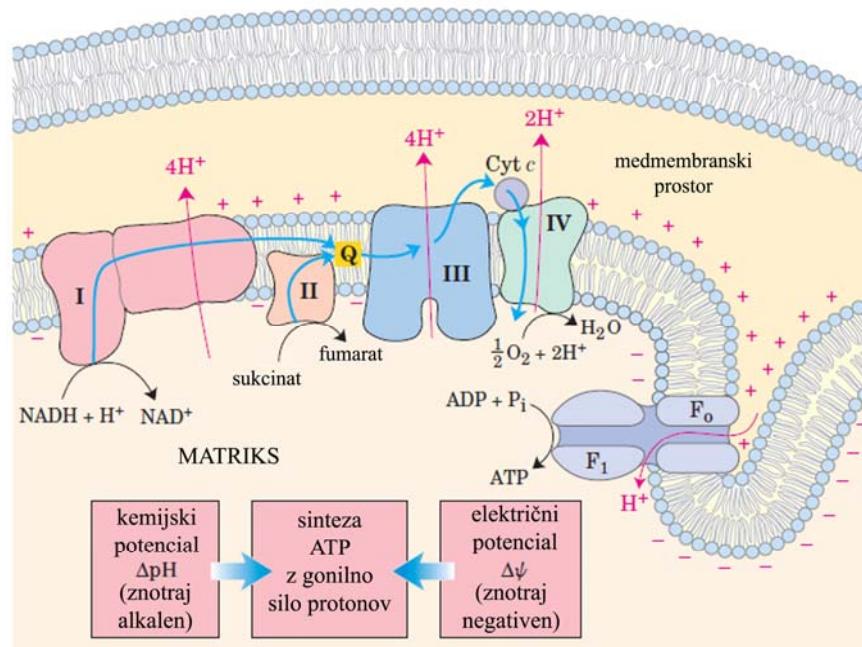
Ključna vloga koencima Q v transportni verigi elektronov je bila, zaradi počasnejših oksidacijsko redukcijskih reakcij v primerjavi z citokromi, nekaj časa vprašljiva. Počasnejše reakcije so kasneje pripisali vsaj 10-krat večji vsebnosti koencima Q v primerjavi z ostalimi prenašalci v verigi.

Raziskave ostalih živalskih in rastlinskih materialov so pokazale univerzalno vlogo koencima Q. V zelenih rastlinah in kloroplastih je bil odkrit kinon z absorpcijskim vrhom pri 254 nm, imenovan plastokinon, ki predstavlja pomemben člen v procesu fotooksidacije. Leta 1975 je Peter Mitchell predstavil vlogo koencima Q v procesu oksidativne fosforilacije. Kasnejše študije so potrdile prisotnost koencima Q ne samo v mitohondrijski, ampak v vseh celičnih membranah (Crane, 2007).

## 2.2 VLOGA KOENCIMA Q<sub>10</sub> V MITOHONDRIJSKI TRANSPORTNI VERIGI ELEKTRONOV

V mitohondrijih se koencim Q<sub>10</sub> nahaja večinoma prosto v lipidnem dvosloju in ima ključno vlogo pri prenosu elektronov iz kompleksa I in II na kompleks III v transportni verigi. Posredno sodeluje tudi v procesu oksidativne fosforilacije pri tvorbi energije v obliki adenozintrifosfata (ATP) (Rötig in sod., 2007).

Transportno verigo elektronov sestavlja vrsta zaporedno nameščenih prenašalcev na notranji membrani mitohondrijev. Vsak med njimi se lahko reducira in ponovno oksidira. Glavni deli verige so štirje veliki beljakovinski kompleksi. Poleg koencimov NADH in FADH<sub>2</sub>, so v kompleksih prisotne še štiri različne molekulske vrste oksidoreduktičnih centrov: flavinmononukleotidi (FMN), železo – žveplovi kompleksi (FeS), koencim Q in citokromi (Boyer, 2005).

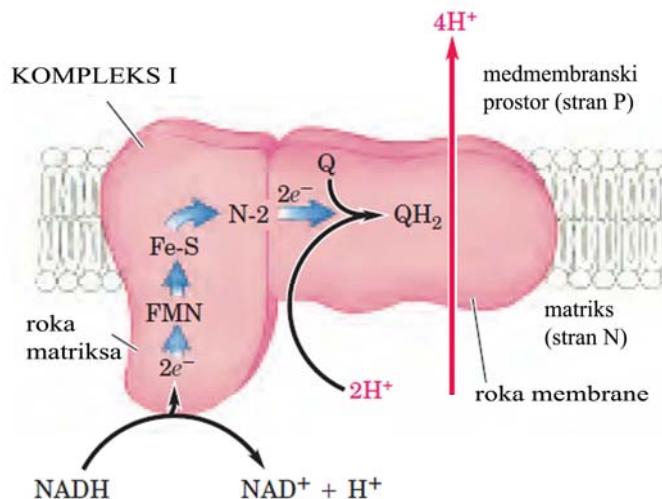


**Slika 3:** Transportna veriga elektronov – shematski prikaz na notranji membrani mitohondrija (Nelson in Cox, 2005).

### 2.2.1 Kompleks I: NADH ubikinon oksidoreduktaza ali krajše NADH dehidrogenaza

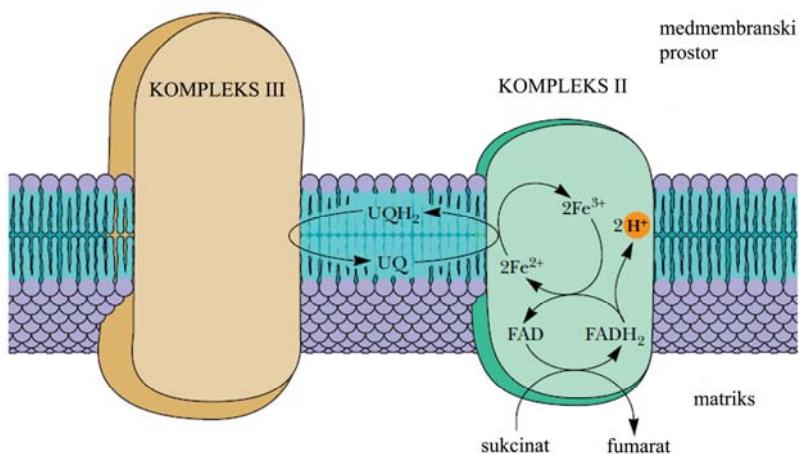
Elektroni se iz NADH prenesejo na prvi prenašalni člen kompleksa, imenovan FMN, ki se pri tem reducira. Reducirani FMNH<sub>2</sub> se reoksidira, ko odda elektrona prostetični skupini s kompleksom FeS atomov. Pot elektronov po kompleksu I se zaključi s prenosom elektronov na koencim Q, ki je najmanjši in najbolj hidrofoben od vseh prenašalcev. Ko

sprejme dva elektrona in dva protiona, se reducira v ubikinol (QH<sub>2</sub>). Ubisemikinon (QH<sup>•</sup>) nastane, ko ubikinol odda en sam elektron (Boyer, 2005).



**Slika 4:** Kompleks I: shematski prikaz delovanja NADH dehidrogenaze (Nelson in Cox, 2005).

### 2.2.2 Kompleks II: sukinat ubikinon oksidoreduktaza ali krajše sukinat dehidrogenaza



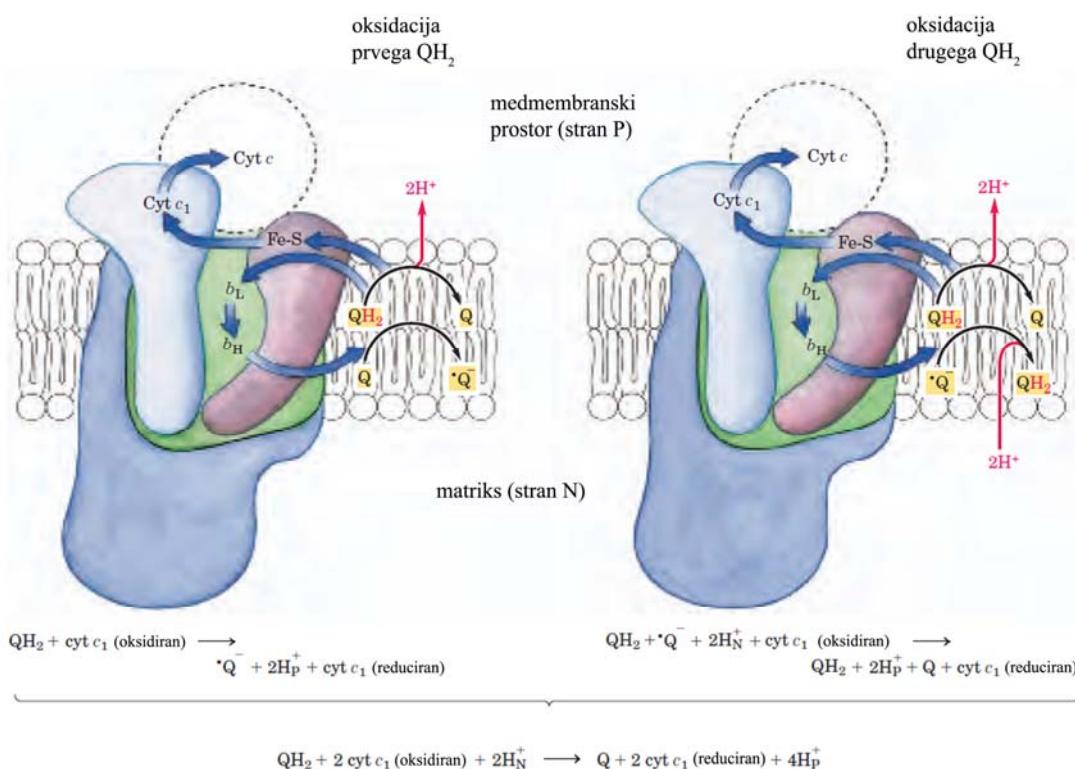
**Slika 5:** Kompleks II: shematski prikaz delovanja sukinat dehidrogenaze (Garrett in Grisham, 2002).

Preko koencima Q vstopajo v verigo tudi elektroni iz koencima FADH<sub>2</sub>. V mitohondrijski membrani sta vsaj dve različici kompleksa II, sukinat dehidrogenaza in acil-CoA dehidrogenaza. Prvi je encim citratnega cikla, drugi pa encim, ki sodeluje pri β-oksidaciji

maščobnih kislin. Za oba je značilno, da usmerjata prenos elektronov iz substratov, ki jih oksidirata (sukcinat in acil-CoA), preko FADH<sub>2</sub>, na koencim Q. Ne glede na to, ali elektroni vstopajo v prenšalno verigo iz NADH ali FADH<sub>2</sub>, morajo pri nadaljnji poti preko ubikinona (Boyer, 2005).

### 2.2.3 Kompleks III: citokrom c reduktaza

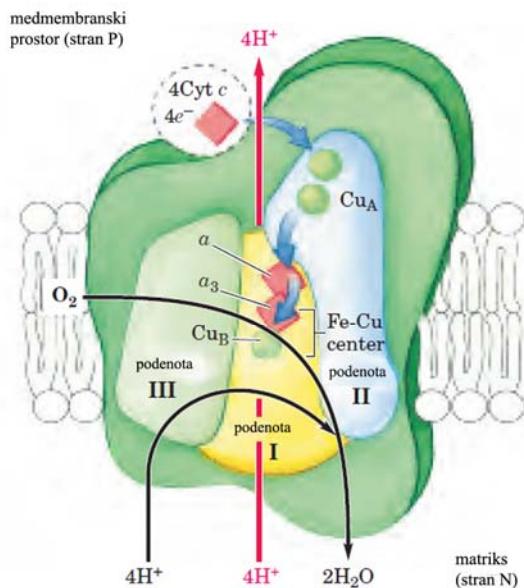
Prenašalci elektronov v tem kompleksu so železo-žvepolovi proteini in citokromi. Elektroni se iz ubikinola prenesejo na citokrom c. Prenos elektronov iz ubikinola ni enostaven. Do zapletov prihaja, ker lahko ubikinol odda dva elektrona hkrati, citokromi pa lahko naenkrat sprejmejo le en elektron. Zaradi tega se elektroni, ki preko ubikinola vstopajo v kompleks III, razdelijo na dve ločeni, a vseeno povezani poti, ki sestavlja tako imenovani Q ciklus. Ta naj bi sodeloval tudi pri vzdrževanju protonskega gradiента, ki je nujen za sintezo ATP. Del elektronov iz ubikinola se porabi za redukcijo citokroma c. Končni rezultat teh reakcij je popolna oksidacija dveh molekul ubikinola, ki imata vezane štiri elektrone. Dva elektrona se porabita za redukcijo dveh molekul citokroma c, preostala dva pa se preneseta na eno molekulo koencima Q, ki se reducira do ubikinola (Boyer, 2005).



Slika 6: Kompleks III: shematski prikaz delovanja citokrom c reduktaze (Nelson in Cox, 2005).

### 2.2.4 Kompleks IV: citokrom c oksidaza

Citokrom c oksidaza je zadnji kompleks v transportni verigi elektronov, sestavljenega iz citokroma a in a<sub>3</sub>. Celoten kompleks sestavlja deset proteinskih podenot z dvema vrstama prostetičnih skupin: hem (a in a<sub>3</sub>) ter dva bakrova iona. Elektroni, ki se prenašajo od citokroma c do kisika, potujejo preko železovih ionov v obeh hemih ter preko bakrovih ionov. Od vseh prenašalnih členov v verigi, lahko le citokroma a in a<sub>3</sub> neposredno preneseta elektrone na kisik. Za redukcijo kisika v vodo so potrebni štirje preneseni elektroni (Boyer, 2005).



**Slika 7: Kompleks IV: shematski prikaz delovanja citokrom c oksidaze (Nelson in Cox, 2005).**

### 2.3 KOENCIM Q<sub>10</sub> KOT ANTIOKSIDANT

Prisotnost koencima Q<sub>10</sub> v vseh celičnih membranah, ne samo v mitohondrijski, kaže na njegovo pomembno antioksidativno vlogo. Poleg ostalih maščobotopnih antioksidantov, kot so tokoferol, karotenoidi in estrogeni, je koencim Q<sub>10</sub> edini, ki ga lahko organizem sintetizira sam. Dolgoletne raziskave na mitohondrijih, liposomih, mikrosomih in lipoproteinih kažejo, da je koencim Q<sub>10</sub> učinkovit antioksidant le v reducirani obliki, kot ubikinol (QH<sub>2</sub>). Delež reducirane oblike v posameznem tkivu pa je v veliki meri odvisen od prisotnosti nekaterih oksidoreduktaz (Bentinger in sod., 2007).

**Preglednica 1: Delež reducirane oblike koencima Q<sub>10</sub> v človeških tkivih (Aberg in sod., 1992; Ruiz-Jimenez in sod., 2007).**

Tkivo	% reduciranega koencima Q <sub>10</sub>
kri	93
srce	47
ledvice	73
jetra	95
mišica	60
možgani	23
trebušna slinavka	100
vranica	87
pljuča	24
črevesje	93

Redukcija koencima Q<sub>10</sub> poteče ob prisotnosti različnih dehidrogenaznih encimov. Med najpomembnejšimi so zlasti NADH citokrom b<sub>5</sub> reduktaza in NADPH citokrom P450 reduktaza, ki ju prištevamo med eno-elektronske reduktaze, ter NAD(P)H kinon reduktaza 1 (NQO1) in NADPH CoQ reduktaza, ki delujeta kot dvo-elektronski reduktazi (Landi in sod., 1997).

### 2.3.1 Antioksidativna vloga koencima Q<sub>10</sub> v procesu oksidacije lipidov

Oksidacija lipidov je proces oksidativne razgradnje lipidov. Prosti radikali odvzemajo elektrone lipidom celične membrane, kar privede do poškodbe celice. Temu procesu so najbolj izpostavljene večkrat nenasicene maščobne kisline. Vsebujejo namreč številne dvojne vezi, med njimi pa ležijo metilne skupine (-CH<sub>2</sub>), ki imajo vezane še posebej reaktivne vodikove atome (Gunstone, 1996).

Proces oksidacije je verižna reakcija in poteka v treh stopnjah (Gunstone, 1996):

- **INICIACIJA**

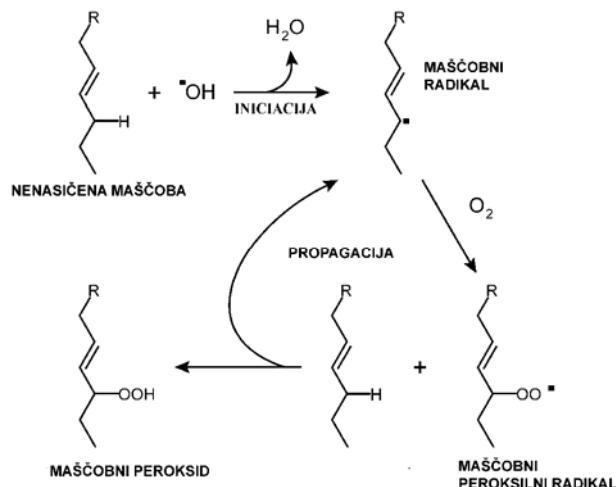
Najpogostejsi iniciatorji te stopnje so reaktivne kisikove zvrsti (ROS), ki po združitvi z vodikovim atomom tvorijo maščobnokislinski radikal in vodo.

- **PROPAGACIJA**

Nastali maščobnokislinski radikal ni stabilna molekula, zato se poveže z molekularnim kisikom in tvori peroksilni-maščobnokislinski radikal, ki pa je prav tako nestabilen ter se poveže z drugimi prostimi maščobnimi kislinami. Pri tem pride do nastanka različnih maščobnokislinskih radikalov in vodikovega peroksida.

## • TERMINACIJA

Verižna reakcija se zaključi, ko med seboj reagirata dva prosta radikala in pride do tvorbe neradikalnih vrst.



**Slika 8: Proces oksidacije lipidov (Gunstone, 1996).**

Reducirana oblika koencima Q<sub>10</sub> varuje membranske fosfolipide pred oksidacijo bodisi neposredno ali preko regeneracije α-tokoferola in askorbata. Koencim Q<sub>10</sub> se je izkazal za bistveno učinkovitejšega inhibitorja lipidne oksidacije v primerjavi z α-tokoferolom. Prekine namreč tako proces iniciacije kot tudi propagacije, α-tokoferol pa ima vpliv samo na proces propagacije (Bentinger, 2007).

Prvo dejanje koencima Q<sub>10</sub> v procesu oksidacije lipidov je preprečitev tvorbe maščobnega peroksilnega radikala (ROO<sup>•</sup>) med iniciacijo. Ubikinol (QH<sub>2</sub>) s tvorbo ubisemikinona (QH<sup>•</sup>) in vodikovega peroksida reducira začetni perferilni radikal. Obstaja tudi možnost direktne odstranitve maščobnega peroksilnega (ROO<sup>•</sup>) radikala (Bentinger, 2007).

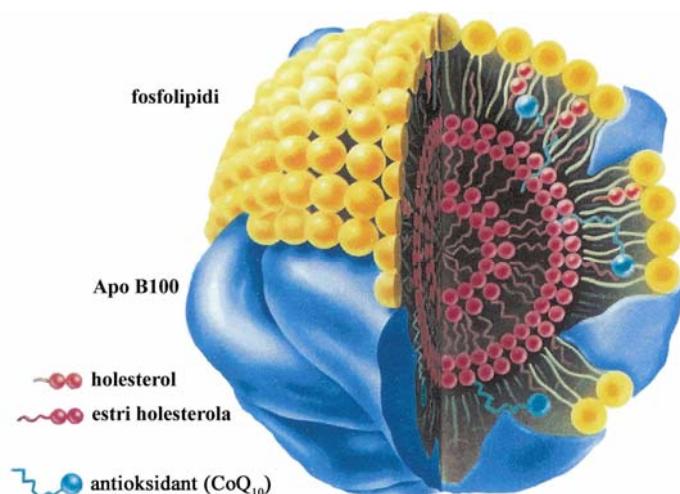
Koencim Q<sub>10</sub> z lovljenjem začetnih perferilnih radikalov preprečuje propagacijo tudi v procesu oksidacije proteinov (Stadtman in Levine, 2000).

Oksidativni stres lahko, s sprožitvijo številnih metabolnih reakcij v celici, vodi do aktivacije nukleaznih encimov, ki cepijo verigo DNA. Koencim Q<sub>10</sub> tudi v tem primeru kaže pomembno vlogo antioksidanta (Ernster in Dallner, 1995).

### 2.3.2 Antioksidativna vloga koencima Q<sub>10</sub> v plazmi

Koencim Q<sub>10</sub> najdemo tudi v plazmi, in sicer v lipoproteinih. Vsebnost v VLDL (lipoproteini zelo majhne gostote) znaša 1,2 nmol/mg, v LDL (lipoproteini majhne gostote) 1,0 nmol/mg in v HDL (lipoproteini velike gostote) 0,1 nmol/mg proteina. Po zaužitju maščob se te vsebnosti nekoliko povečajo (Mohr in sod., 1992).

V vseh tkivih je vsebnost koencima Q<sub>10</sub> od 6 do 10-krat večja v primerjavi z vitaminom E, v krvi pa njegova vsebnost predstavlja samo 1/10 vsebnosti vitamina E, glavnega maščobotopnega antioksidanta v krvi. Kljub temu pa ostaja koencim Q<sub>10</sub>, zaradi izredno učinkovitega reduktivnega mehanizma v krvi, vedno v aktivni obliki ter sodeluje pri regeneraciji vitamina E iz  $\alpha$ -tokoferoksilnega radikala (Stocker in sod., 1991).



**Slika 9: Shema lipoproteina Apo B100 z lepo vidnim položajem antioksidantov (CoQ<sub>10</sub>) (Littarru in Langsjoen, 2007).**

### 2.3.3 Koencim Q<sub>10</sub> kot prooksidant

Znano je, da prepuščanje elektronov med celičnim dihanjem v mitohondrijih vodi do nastanka superoksidnih anionskih radikalov in vodikovega peroksida. Del ubisemikinona (QH<sup>•</sup>), ki se nahaja na zunanji strani membrane, na meji z vodno fazo, je izpostavljen avtooksidaciji in tvorbi superoksidnih anionskih radikalov. Te reakcije dokazujejo, da lahko koencim Q<sub>10</sub> pod določenimi pogoji deluje kot prooksidant (Nohl in sod., 1998).

Kasnejše študije so pokazale, da so reakcije tvorbe superoksidnih anionskih radikalov omejene predvsem na liposomalne sisteme z visoko koncentracijo koencima Q<sub>10</sub> in, da je možnost takih situacij v bioloških membranah majhna. Koncentracija encimov, odgovornih za redukcijo koencima Q<sub>10</sub>, je namreč tako visoka, da se večji delež koencima nahaja v reducirani obliki tudi po izolaciji iz različnih tkiv (Bentinger in sod., 2007).

## 2.4 SKUPNE BIOSINTEZNE POTI KOENCIMA Q<sub>10</sub> IN HOLESTEROLA

Biosinteza holesterola poteka v glavnem v jetrih, medtem ko se lahko koencim Q<sub>10</sub> pod normalnimi pogoji sintetizira praktično v vseh tkivih in celicah. Jetra sintetizirajo dve tretjini holesterola, tretjino priporočljive dnevne količine pa zapolni prehranski vnos. Na osnovi tega nam količina holesterola v krvi pomaga diagnosticirati stanje v organih. V primeru koencima Q<sub>10</sub> to ni možno, ker poteka sinteza v zadostnih količinah, torej prevzem iz hranil ni potreben in je omejen (Bentinger in sod., 2007).

### 2.4.1 Biosinteza koencima Q<sub>10</sub>

Biosinteza poteka v treh glavnih stopnjah (Grunler in sod., 1994):

- sinteza benzokinonskega obroča iz 4-hidroksibenzojske kisline, ki izhaja iz tirozina, esencialne aminokisline sesalcev;
- sinteza poliizoprenoidne stranske verige iz dimetilalil difosfata in izoprenil difosfata, ki nastajata iz acetil-CoA v **mevalonatni poti**, vključene tudi v biosintezo **holesterola**;
- sklopitev sintetiziranih struktur.

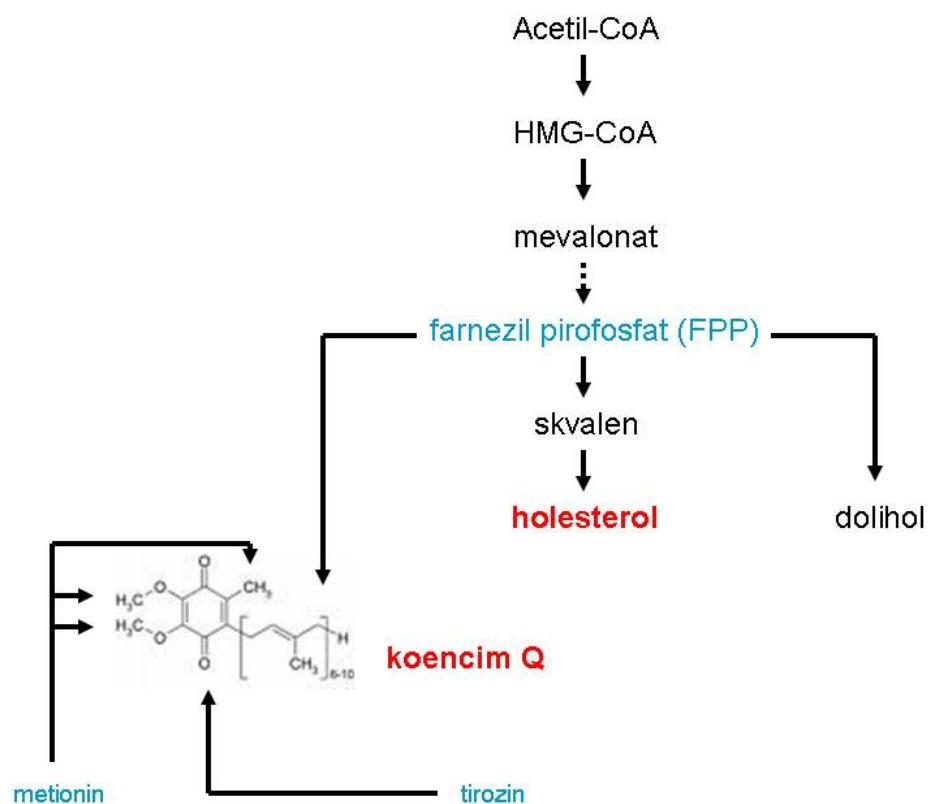
Pri biosintezi koencima Q<sub>10</sub> sodelujejo tudi vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, vitamin C, folna kislina, niacinamid in pantotenska kislina (Mason, 2001).

### 2.4.2 Biosinteza holesterola

Biosinteza poteka v štirih stopnjah (Boyer, 2005):

- V prvi stopnji se acetil-CoA uporabi za sintezo **mevalonata**, spojine s 6 ogljikovimi atomi. Tri molekule acetil-CoA se združijo v dveh zaporednih reakcijah in nastane 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Te reakcije lahko potekajo praktično v vseh celicah, najbolj intenzivno pa v jetrih. Encimi, ki katalizirajo te reakcije, so del membrane endoplazmatskega retikuluma, vendar produkti nastajajo v celicah.
- Sledijo štiri reakcije, ki pretvorijo mevalonat, intermediat s 6 ogljikovimi atomi, v aktivirana izoprena, intermediate s 5 ogljikovimi atomi. V treh zaporednih reakcijah mevalonat sprejme tri fosforilne skupine, vsako iz druge molekule ATP. Nato poteče dekarboksilacija produkta, 3-fosfo-5-pirofosfomevalonata, do izopentenilpirofosfata. Omenjena molekula je ena od dveh izoprenov. Ta je v ravnotežju z drugo izoprensko obliko, dimetilalilpirofosfatom.
- V tretji stopnji poteka sinteza skvalena, ogljikovodika s 30 ogljikovimi atomi, z zaporedno kondenzacijo več izoprenskih enot. Dve izoprenski enoti kondenzirata do geranilpirofosfata, spojine z 10 ogljiki. Dodatek še enega izoprena vodi do spojine s 15 ogljiki, farnezilpirofosfata. S kondenzacijo dveh intermediatov s 15 ogljikovimi atomi nastane močno nenasičen ogljikovodik, imenovan skvalen.

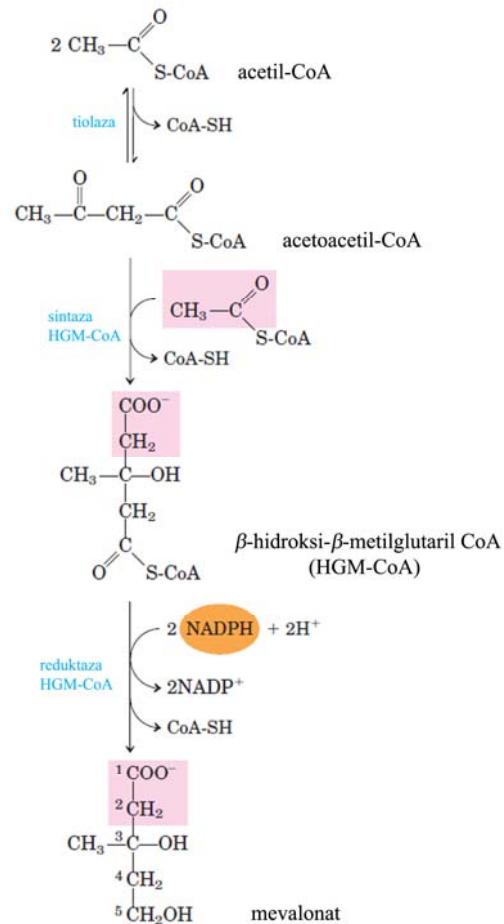
- V zadnji stopnji poteka ciklizacija skvalena in njegova pretvorba do holesterola. Ključni intermediat, s katerim se proces ciklizacije začne, je skvalen-2,3-epoksid. Prvi intermediat v sintezi holesterola, ki že ima popoln steroidni obročni sistem, je lanosterol. Za njegovo pretvorbo v holesterol je potrebnih vsaj 20 encimsko kataliziranih reakcij, ki vključujejo odstranitve metilnih skupin in prenestitve dvojnih vezi.



Slika 10: Shematski prikaz biosinteze poti koencima Q in holesterola (Shinde in sod., 2005).

### 2.4.3 Pomen encima HMG-CoA reduktaze

HMG-CoA reduktaza katalizira nastanek mevalonata ter predstavlja glavni regulatorni encim v začetnih fazah biosinteze holesterola in koencima Q<sub>10</sub> (Hargreaves, 2003).



Slika 11: Shematski prikaz biosintezne poti mevalonata (Garrett in Grisham, 2002).

Kontrola biosinteze holesterola in koencima Q<sub>10</sub> se s tremi encimi (skvalen sintaze za sintezo holesterola, trans-prenil transferaze za sintezo koencima Q<sub>10</sub> in cis-prenil transferaze za sintezo dolihola, izoprenoidnega alkohola) izvaja tudi v nadaljnjih fazah mevalonatne poti (Turunen in sod., 2002).

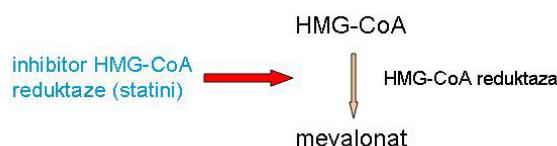
Glavni del mevalonatne poti predstavlja zaporedje reakcij, ki vodijo do tvorbe farnezil pirofosfata (FPP) iz acetil-CoA. FPP predstavlja zadnji skupni substrat za biosintezo številnih končnih produktov, vključno s koencimom Q<sub>10</sub>. Različni encimi imajo različno afiniteto do substrata FPP. Znano je, da imata trans- in cis-preniltransferazi pri človeku in podganah višjo afiniteto do FPP v primerjavi s skvalen-sintazo. Posledično začetna inhibicija HMG-CoA reduktaze vpliva na skvalen sintazo ter s tem na sintezo holesterola.

Nadaljnja inhibicija reduktaze vpliva tudi na druga dva encima, s tem pa na sintezo koencima Q<sub>10</sub> (Low in sod., 1992).

#### 2.4.4 Vpliv statinov na biosintezo holesterola in koencima Q<sub>10</sub>

Statini so poznani kot zdravila, ki inhibirajo delovanje HMG-CoA reduktaze ter na ta način znižujejo koncentracijo holesterola v krvi (Littarlu in Langsjoen, 2007).

Učinek statinov (inhibitorjev HMG-CoA reduktaze) na vsebnost koencima Q<sub>10</sub> so prvi opazili Ghirlanda in sod. (1993). Prišlo je namreč do zmanjšanja koncentracije koencima Q<sub>10</sub> v plazmi. Izkazalo se je, da statini vplivajo predvsem na raven LDL delcev, v katerih je prisotnega večino koencima. Pozneje je bilo opazno zmanjšanje koncentracije koencima Q<sub>10</sub> tudi v limfocitih. Prav tako so se začeli pojavljati namigi, da statini zmanjšujejo raven koencima Q<sub>10</sub> v mišicah, vendar ti mehanizmi še niso povsem raziskani.



Slika 12: Vpliv statinov na HMG-CoA reduktazo (Marcoff in Thompson, 2007).

#### 2.4.5 Vpliv fenilketonurije in mevalonske acidurije na biosintezo koencima Q<sub>10</sub> in holesterola

Na biosintezo koencima Q<sub>10</sub> in holesterola vplivata tudi dve prirojeni okvari v metabolizmu, fenilketonurija in mevalonska acidurija. Prva okvara nastane zaradi pomanjkanja encima fenilalanin 4-hidroksilaze, druga pa zaradi pomanjkanja encima mevalonat kinaze (Scriver in sod., 1995).

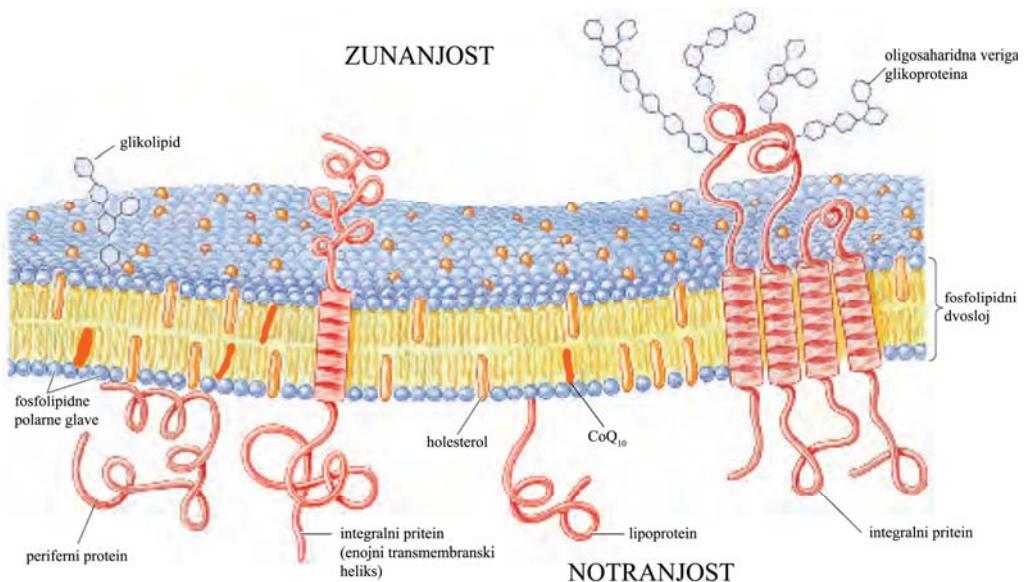
Zmanjšanje koncentracije koencima Q<sub>10</sub> pri pacientih z mevalonsko acidurijo pripisujejo pomanjkanju mevalonat kinaze, encima, vključenega v biosintezno pot holesterola in koencima Q<sub>10</sub>. Raziskave pa kažejo, da na zmanjšanje koncentracije vpliva še nek drugi dejavnik. Vsebnost holesterola namreč ostaja normalna oziroma se le malo zmanjša (Hargreaves, 2007).

Glavni dejavnik, povezan z zmanjšanjem koncentracije koencima Q<sub>10</sub> pri pacientih s fenilketonurijo, je povečana vsebnost fenilalanina. Fenilalanin 4-hidroksilaza katalizira hidroksilacijo fenilalanina do tirozina. Pomanjkanje encima vodi do kopiranja fenilalanina v tkivih in plazmi, kar vpliva na zmanjšanje aktivnosti encima HMG-CoA reduktaze (Artuch in sod., 2001).

## 2.5 VLOGA KOENCIMA Q<sub>10</sub> IN HOLESTEROLA V CELIČNIH MEMBRANAH

Poliizoprenoidne spojine, kamor spadata tudi holesterol in koencim Q<sub>10</sub>, so v membranah nameščene v hidrofobnem delu lipidnega dvosloja, med fosfolipidnimi maščobnimi kislinami. Takšna pozicija koencima Q<sub>10</sub> vpliva na povečanje fluidnosti in permeabilnosti membrane, medtem ko je za holesterol značilno, da membrano stabilizira, zmanjša pa njenjo fluidnost (Lenaz in sod., 1992).

Koencim Q<sub>10</sub> ima takšen vpliv na membrano zaradi metoksilnih skupin na benzokinonskem obroču ter zaradi interakcij med kinolnimi skupinami in fosfolipidnimi molekulami. Tako pomanjkanje kot presežek koencima Q<sub>10</sub> lahko porušita ravnotežje med komponentami, ki membrano stabilizirajo oziroma destabilizirajo. V primeru pomanjkanja koencima Q<sub>10</sub> mora celica, za vzpostavitev ravnotežja v membrani, uporabiti zunanje vire koencima. Kadar pa je membrana prenasičena s koencimom Q<sub>10</sub>, je zunanjji vnos blokiran, koencim Q<sub>10</sub> ostaja v luminalnem predelu, ali pa je pritrjen na vodotopne proteine. Takšna lokalizacija ne omejuje koencima Q<sub>10</sub> pri opravljanju funkcij, med katerimi je najpomembnejša njegova antioksidativna vloga (Low in sod., 1992).



**Slika 13:** Shematski prikaz položaja holesterola in koencima Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) v citoplazemski membrani (Nelson in Cox, 2005).

## 2.6 PORAZDELITEV KOENCIMA Q<sub>10</sub> V TELESU

Koencim Q<sub>10</sub> je prisoten v vseh celicah in tkivih, vendar se koncentracije med seboj močno razlikujejo. V plazmi je vsebnost koencima Q<sub>10</sub> precej manjša v primerjavi z vitaminoma E in C, v tkivih pa bistveno presega koncentracijo vitamina E. Največ koencima Q<sub>10</sub> je prisotnega v srcu, jetrih in ledvicah, torej v tkivih z najvišjo stopnjo oksidativnega

metabolizma. V koži je njegova koncentracija relativno nizka, maksimum doseže med 20- in 30-letom. V epidermisu je vsebnost 10-krat večja kot v dermisu (Barshop in Gangoiti, 2007).

Študije so pokazale sorazmerno večje koncentracije koencima Q<sub>10</sub> v lizosomih in Golgijevih membranah v primerjavi z mitohondrijskimi membranami mikrosomov. Prav tako so opazne razlike v koncentracijah koencima Q<sub>10</sub> v mitohondrijih, izoliranih iz različnih tkiv. Za mitohondrije srčne mišice so značilne 3,6-krat, 3,3-krat, 2,7-krat in 1,5-krat večje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v primerjavi z mitohondriji ledvic, jeter, možganov in skeletnih mišic (Lass in Sohal, 2000).

**Preglednica 2: Vsebnost koencima Q<sub>10</sub> v človeških tkivih (Aberg in sod., 1992; Ruiz-Jimenez in sod., 2007).**

Tkivo	koencim Q <sub>10</sub> (µg/g)
kri	0,89
srce	114
ledvice	67
jetra	55
mišica	40
možgani	13
trebušna slinavka	33
vranica	25
pljuča	8
črevesje	12

## 2.7 POMANJKANJE KOENCIMA Q<sub>10</sub>

Ob pravilni prehrani je človek sposoben sintetizirati dovolj koencima Q<sub>10</sub>, zato pomanjkanja v splošni populaciji ni zaznati. Po tridesetem letu starosti pa začne endogena raven koencima Q<sub>10</sub> počasi upadati. Študije kažejo 30-60 % zmanjšanje koncentracije koencima Q<sub>10</sub> v različnih tkivih med procesom staranja (Rustin in sod., 2004).

Pomanjkanje koencima Q<sub>10</sub> je opazno tudi pri ljudeh s (Quinzii in sod., 2007):

- kardiovaskularnimi boleznimi;
- neurodegenerativnimi boleznimi (Parkinsonova bolezen, Alzheimerjeva bolezen...);
- diabetesom;
- rakavimi obolenji;
- mitohondrijskimi motnjami.

## 2.8 KOENCIM Q<sub>10</sub> KOT PREHRANSKI DODATEK

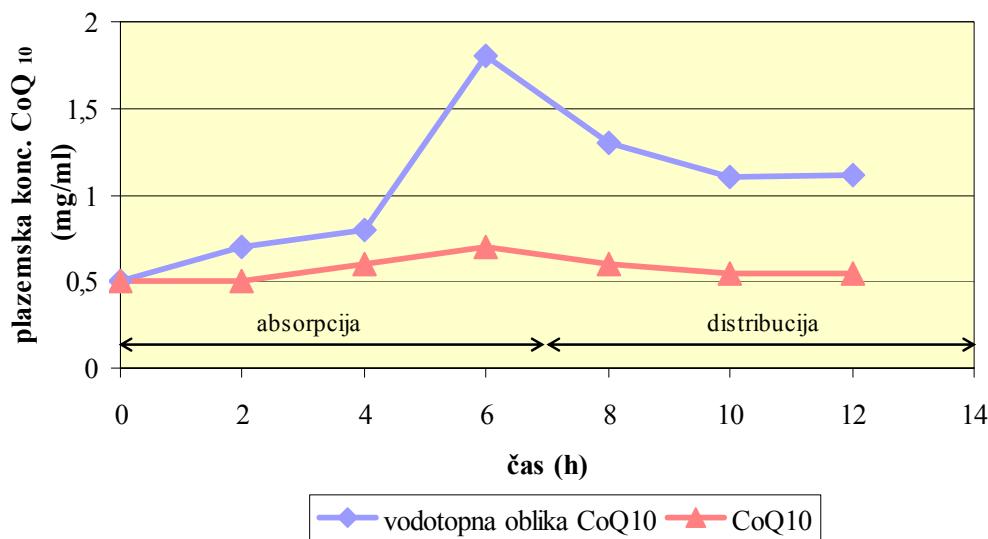
Privzem koencima Q<sub>10</sub> poteka v krvi, krvnih žilah, jetrih in vranici, medtem ko v drugih organih večinoma ne. Privzem je močno povečan v primeru pomanjkanja, drugače pa je omejen (Bhagavan in Chopra, 2007).

Priporočena dnevna doza koencima Q<sub>10</sub> znaša med 30-60 mg, za terapevtske namene pa bistveno več, med 100-300 mg (Fidimed, 2008).

Biokemijske lastnosti koencima Q<sub>10</sub> pomembno vplivajo na njegov privzem in distribucijo v telesu. Koencim Q<sub>10</sub> je zaradi dolge lipofilne izoprenske verige praktično netopen v vodi, zato je prva stopnja po njegovem privzemu vgraditev v hilomikrone. V takšni obliki se koencim Q<sub>10</sub> absorbira iz tankega črevesa, od tam pa prehaja v jetrne celice. Jetra ga sprostijo v kri skupaj z lipoproteini, kjer ima največjo afiniteto do VLDL in LDL (Kaikkonen in sod., 2002).

Za koencim Q<sub>10</sub> je značilen proces nelinearne absorpcije, ki je odvisen od številnih aktivnih in pasivnih transportnih mehanizmov (Palamakula in sod., 2005).

Plazemska koncentracija koencima Q<sub>10</sub> začne naraščati približno 1-2 uri po zaužitju na prazen želodec. Maksimalno koncentracijo doseže po 6-8 urah. Faza distribucije koencima Q<sub>10</sub> nastopi po dosegu maksimalne koncentracije in traja od 6 do 12 ur. Čas, potreben za doseg maksimalne koncentracije koencima Q<sub>10</sub>, je lažje predvideti pri vodotopnih kot pri maščobotopnih oblikah koencima Q<sub>10</sub> (Hosoe in sod., 2007).



Slika 14: Absorpcija in distribucija različnih oblik koencima Q<sub>10</sub> (Hosoe in sod., 2007).

Raziskave so pokazale vpliv eksogenega koencima Q<sub>10</sub> na mitohondrije, izolirane iz skeletnih mišic, limfocitov in nevronskih celic (Niklowitz in sod., 2004).

V primeru, ko je bil proces oksidativne fosforilacije moten, je tretiranje s koencimom Q<sub>10</sub> privedlo do povečanja tvorbe energije v obliki ATP v izoliranih limfocitih. Ostali vitamini in kofaktorji, vključno z askorbinsko kislino, vitaminom E, riboflavinom, tiaminom, niacinom, vitaminom A in karnitinom, niso pokazali posebnega učinka na povečanje sinteze ATP (Marriage in sod., 2004).

### **2.8.1 Izboljšanje biološke razpoložljivosti koencima Q<sub>10</sub>**

Absorpcija koencima Q<sub>10</sub> v tkiva je omejena predvsem zaradi njegove lipofilne narave. V ta namen so bile razvite številne vodotopne oblike koencima Q<sub>10</sub>, ki vplivajo na izboljšanje absorpcije ter s tem na povečanje biološke razpoložljivosti (Terao in sod., 2006). Obstajajo različne metode izboljšanja topnosti lipofilnih komponent v vodi: amorfna (neorganizirana) oblika, micle in vključitveni kompleksi. Med naštetimi je najbolj razširjena uporaba ciklodekstrinov (CD), predvsem zaradi obstojnosti teh kompleksov pri segrevanju, oksidaciji in izpostavitvi UV svetlobi (Stella in Rajewski, 1997).

CD so bili prvič omenjeni leta 1981. Substanco so izolirali po razgradnji škroba z bakterijo *Bacillus amylobacter* ter ji določili kemijsko sestavo (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O. Spojino so najprej imenovali »cellulosine«, kasneje pa so jo preimenovali v ciklodekstrin (Szejtli, 1998).

CD sodijo v skupino makrocikličnih oligosaharidov. Osnovne gradbene enote so molekule D-glukoze s konformacijo stola. Molekulo lahko opišemo kot konično oblikovan kanal s hidrofobno notranjostjo in hidrofilno zunanjostjo. Vodikovi atomi na C3 in C5 (metilni skupini) ter nevezni elektronski pari kisika v α-1,4-o-glikozidnih vezeh dajejo notranjosti molekule hidrofoben značaj. Glede na število glukoznih enot, ki tvorijo molekulo CD, ločimo α-CD, β-CD in γ-CD s šestimi, sedmimi in osmimi glukoznimi enotami (Gattuso in sod., 1998).

CD so produkti naravne razgradnje škroba s specifičnim encimom ciklodekstrin-glikoziltransferazo (CGT). Ta encim lahko sintetizirajo različni mikroorganizmi: *Bacillus macerans*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus circulans*, *Alkalophylic bacillus*... Poznani so tudi trije industrijski načini proizvodnje CD; postopek s topili, ki tvorijo kompleks, postopek s topili, ki ne tvorijo kompleksa in postopek z encimsko pretvorbo škroba (Biwer, 2002).

Terao in sod. (2006) so s številnimi eksperimenti dokazali, da uporaba kompleksov CoQ<sub>10</sub>-γ-CD in CoQ<sub>10</sub>-MCC (mikrokristalinična celuloza) bistveno izboljša absorpcijo in posledično biološko razpoložljivost koencima Q<sub>10</sub>. Pri kompleksu

CoQ<sub>10</sub>-γ-CD je bilo zaznati 47,60 % povečanje plazemske koncentracije koencima Q<sub>10</sub>, medtem ko je pri kompleksu CoQ<sub>10</sub>-MCC koncentracija narasla za samo 13,8 %.

Biološka razpoložljivost koencima Q<sub>10</sub> je močno odvisna od prehrane. Zaradi tega lahko po zaužitju kompleksov koencima Q<sub>10</sub> prihaja do oblikovanja različnih absorpcijskih profilov (Weber in sod., 1997):

- strmo naraščanje do maksimalne plazemske koncentracije;
- počasno, linearno naraščanje plazemske koncentracije;
- komaj opazno naraščanje plazemske koncentracije kot posledica slabe absorpcije.

## 2.9 METODE DOLOČANJA KOENCIMA Q<sub>10</sub> V RAZLIČNIH TKIVIH

V zadnjih desetletjih so bile razvite številne metode za določanje koencima Q<sub>10</sub> v različnih tkivih. Izziv predstavlja predvsem hidrofobna narava koencima Q<sub>10</sub> in njegova velika podvrženost oksidaciji (Barshop in Gangoiti, 2007).

Klasične metode vključujejo ekstrakcijo s heksanom (Finckh in sod., 1995). Pogosta je uporaba etanola ali kombinacija heksana in metanola. Večina novejših metod vključuje uporabo 1-propanola, ker omogoča enkratno (1-krat) ekstrakcijo in direktno injiciranje (Wang in sod., 1999).

Souchet in Laplante (2007) poročata o uporabi različnih reagentov, potrebnih za čim boljšo homogenizacijo vzorca v procesu ekstrakcije: natrijev fosfatni pufer, natrijev dodecil sulfat (SDS) in natrijev klorid (NaCl) ter različne kombinacije med njimi. Za najbolj učinkovito se je izkazala kombinacija NaCl in SDS. Po mnenju Burtona in sod. (1985) je za homogenizacijo najbolj zaželjena uporaba SDS, ker poveča topnost membranskih proteinov.

Začetne metode merjenja koencima Q<sub>10</sub> vključujejo UV detekcijo in absorpcijo pri 275 nm. Z razvojem elektrokemijske detekcije (ECD) pride do bistvenega izboljšanja občutljivosti in specifičnosti. Uporaba in-line elektrokemijske celice omogoča istočasno detekcijo ubikinola in ubikinona, torej skupnega koencima Q<sub>10</sub> (Finckh in sod., 1995).

Za uspešno metodo detekcije koencima Q<sub>10</sub> po separaciji se je izkazala reverzno fazna visokotlačna tekočinska kromatografija (RP-HPLC). Mobilna faza je v večini primerov sestavljena iz nižjih alkoholov. Metode, ki temeljijo na elektrokemijski detekciji, imajo prisoten acetat ali perklorat, ki opravlja funkcijo elektrolitov (Wang in sod., 1999).

Hansen s sod. (2004) je razvil dve občutljivi in selektivni LC-MS metodi (tekočinska kromatografija sklopljena z masnim spektrometrom) za kvantifikacijo skupnega koencima

Q<sub>10</sub> v krvi človeka. Obe metodi sta se izkazali za bolj selektivni in učinkoviti v primerjavi s HPLC.

Teshima s sod. (2005) je vpeljal enostavno in učinkovito metodo za detekcijo koencima Q<sub>9</sub> in Q<sub>10</sub> v mišicah in srcu podgane z uporabo LC-MS/MS.

Prav tako je Stražišar s sod. (2005) razvila metodi LC in LC-MS za določanje koencima Q<sub>10</sub> v mlečnih izdelkih. Rezultati kažejo na večjo občutljivost MS v primerjavi z UV detekcijo.

### 2.9.1 Ekstrakcija s trdno fazo (SPE)

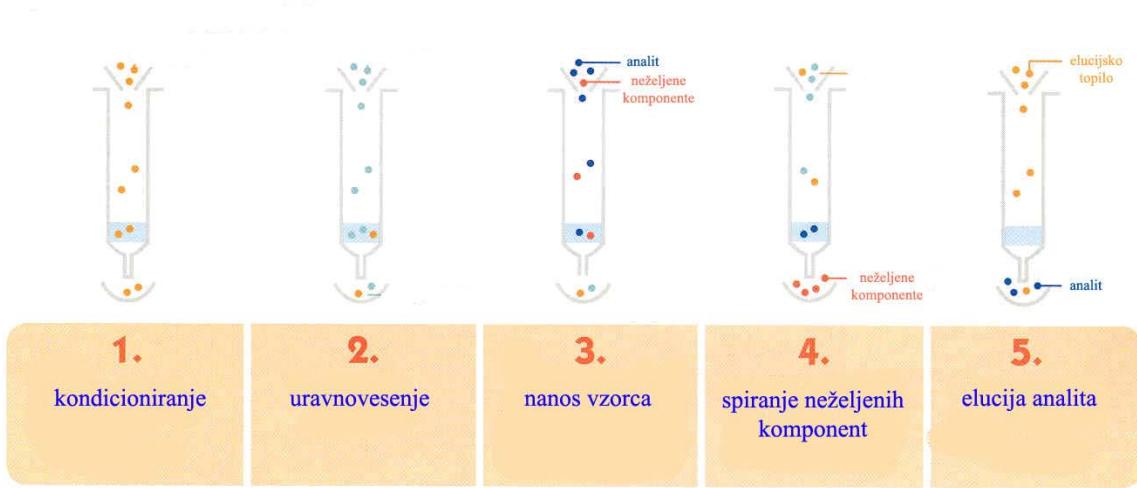
Ekstrakcija s trdno fazo (solid-phase extraction; SPE) je danes že dobro uveljavljena tehnika in se uporablja za analize številnih skupin komponent v različnih vrstah matriksov. Zaradi možnosti uporabe velikih volumnov vzorcev, se SPE uporablja za določanje organskih onesnaževalcev v vzorcih voda iz okolja. Uporablja se tudi za analize v biomedicini, farmaciji ter za analize hrane in pijač (Brodnjak Vončina, 2006).

Glavne prednosti SPE v primerjavi z ekstrakcijo tekoče-tekoče (LLE):

- majhna poraba organskih topil, za katere ni potrebna tako visoka čistost;
- manjši volumen vzorca (50-100 µl);
- krajši čas priprave vzorca;
- visok izkoristek ekstrakcije za analizirano spojino;
- možnost avtomatizacije procesa.

Princip ekstrakcije SPE (Brodnjak Vončina, 2006):

- **Kondicioniranje kolone;** v tej stopnji aktiviramo površino polnila, da dosežemo boljšo vezavo merjene komponente. Največkrat jo izvedemo z acetonitrilom ali s čistim etanolom.
- **Uravnoesenje kolone;** odstranitev aktivacijskega topila s tekočino, ki ima podobno sestavo kot matriks. Polnilo običajno speremo z vodo ali s pufrom pri pH, pri katerem poteka ekstrakcija merjene komponente.
- **Nanos vzorca;** polnilo bo zadržalo merjeno komponento. Volumen vzorca igra pomembno vlogo pri izkoristku ekstrakcije. Pomembna je tudi hitrost pretoka vzorca, saj je od nje odvisna kvantitativnost vezave analita na polnilo.
- **Spiranje neželjenih komponent;** neželjene komponente odstranimo iz kolone s spiranjem z vodo ali primernim pufrom. Pri tem pazimo, da ne pride do izpiranja iskane komponente. Po končanem spiranju sledi sušenje polnila z zrakom (vakuum) ali s prepohovanjem s suhim dušikom. Sušenje običajno traja nekaj minut.
- **Elucija analita;** analit speremo iz polnila s primernim organskim topilom. Pomembno je, da elucija poteka počasi, največkrat topilo samo teče skozi kolono. Izkoristek ekstrakcije je močno odvisen od hitrosti pretoka.



Slika 15: Shematski prikaz delovanja SPE (Phenomenex, 2008).

#### 2.9.1.1 Izbira primernega ekstrakcijskega mehanizma in polnila

Pri SPE se največkrat uporablajo trije ekstrakcijski mehanizmi: reverzni, normalni in ionsko izmenjevalni. Izbira mehanizma polnila (sorbenta) je odvisna od polarnosti merjene komponente (Phenomenex, 2008).

#### Reverzna faza

Ekstrakcija hidrofobnih ali polarnih spojin iz vodnih matrikov.

*Sorbenti*: strata-X, C18, C8, Fenil, CN.

*Primer*: ekstrakcija pesticidov iz vodnega matriksa.

#### Normalna faza

Ekstrakcija polarnih spojin iz nepolarnih topil.

*Sorbenti*: Silica, CN, **Florisil**, NH<sub>2</sub>.

*Primer*: ekstrakcija pesticidov iz maščobnih tkiv; ekstrakcija holesterola in oksidov holesterola iz mesa in mesnih izdelkov.

#### Ionsko izmenjevalna

Ekstrakcija nabitih spojin iz vodnih in nepolarnih organskih vzorcev.

*Sorbenti*: Strata-X-C, Strata-X-CW, Strata-X-AW, WAX, SAX, WCX, SCX.

*Primer*: ekstrakcija raznih drog in njihovih metabolitov iz krvi in urina (npr. amfetamin, kodein, metadon...); ekstrakcija akrilamida iz olja; ekstrakcija aminokislin iz mesa, vina.

### 2.9.1.2 Florisil kot polnilo

Florisil, poznan pod tržnim imenom U.S. Silica Co., je visoko selektivni adsorbent, za katerega je značilna široka uporaba v pripravljalni in analitični kromatografiji. Gre za edinstven, ekstremno bel, trden (odporen) prah magnezijevega silikata (Silica Company, 2008).

**Preglednica 3: Kemijska sestava florisila (Silica Company, 2008).**

Spojina	odstotek (%)
SiO <sub>2</sub> (silicijev dioksid)	84,0
MgO (magnezijev oksid)	15,5
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (natrijev sulfat)	0,5

Florisil se lahko uporablja v različne namene:

- splošna kolonska kromatografija;
- tankoplastna kromatografija;
- stopenjska tekočinska kromatografija;
- izolacija steroidov, estrov, ketonov, gliceridov, alkaloidov in nekaterih ogljikovodikov;
- čiščenje pesticidov in ostalih kloriranih ogljikovodikov;
- **separacija maščob, olja in voskov;**
- čiščenje farmacevtskih proizvodov (antibiotiki...);
- separacija aromatičnih komponent;
- analize vitaminov.

### 3 MATERIAL IN METODE DELA

#### 3.1 MATERIAL IN NAČRT POIZKUSA

V poizkus je bilo vključenih 200 piščancev provenience Ross 308, razdeljenih v 5 skupin. Skupine so bile oblikovane glede na različno dolžino krmljenja piščancev z vodotopnim koencimom Q<sub>10</sub>.

Poizkus se je začel 28. 3. 2006 in bil končan 9. 5. 2006.

**Preglednica 4: Razporeditev piščancev provenience Ross 308 po skupinah.**

Skupina	dodatek koencima Q <sub>10</sub> (mg/dan)	čas dodajanja koencima Q <sub>10</sub> (dni)	število piščancev
S10	5	10	25
S20	5	20	25
S30	5	30	25
S40	5	40	25
kontrolna	-	-	100

Piščanci provenience Ross 308 so bili ob zakolu stari 41 dni. Pred zakolom je bila piščancem odvzeta kri in do analize ustrezno shranjena pri -20 °C. Po zakolu so bila posamezna tkiva (srce, jetra, prsa, bedra, perutničke, maščoba) ustrezno ločena in shranjena pri -20 °C. Naknadno je bila izvedena tudi ločitev kože od prsi in beder ter ustrezno shranjena do analize. Vzorci so bili vakuumsko pakirani in ustrezno označeni.

##### 3.1.1 Priprava krme

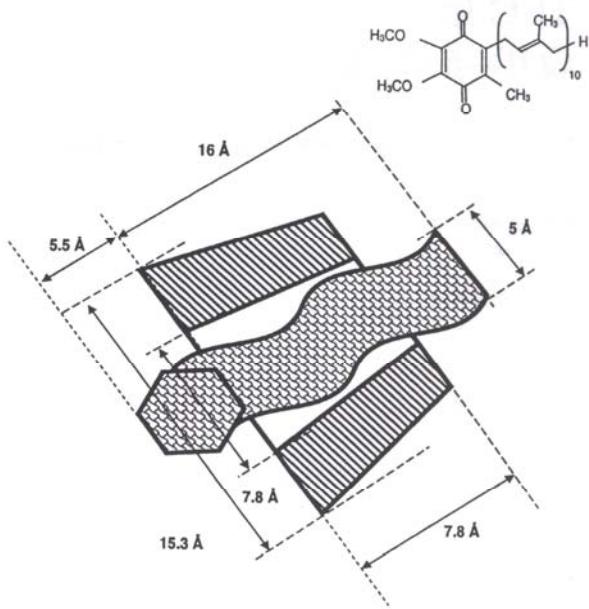
Priprava krme je potekala večstopenjsko. Upoštevan je bil režim hranjenja piščancev med samo vzrejo. Izračun je izhajal iz predpostavke, da bodo piščanci ves čas krmljenja prejemali obrok, ki bo vseboval približno 5 mg koencima Q<sub>10</sub> dnevno. Pripravljena je bila predmešanica, ki se je redčila z dodatkom krmila tako, da je končna mešanica vsebovala 0,0042 % koencima Q<sub>10</sub>. S tako pripravljeno krmo so bili piščanci hrani ustrezeno število dni, v skladu s protokolom. Pripravljeno je bilo 325 kg krmila BRO-G in 175 kg BRO-F2, kar je zadostovalo za izvedbo poizkusa. V poizkusu je bilo uporabljeno 288 g vodotopnega koencima Q<sub>10</sub>, kar ustreza 21,0 g čistega koencima Q<sub>10</sub>.

##### 3.1.2 Preparat

Vodotopni koencim Q<sub>10</sub> (inkluzijski kompleks β-ciklodekstrina in koencima Q<sub>10</sub>) z ustreznimi analiznimi certifikati, ki potrjujejo 7,3 % vsebnost koencima Q<sub>10</sub> v preparatu, je priskrbel Laboratorij za prehrambeno kemijo na Kemijskem inštitutu. Do uporabe je bil preparat hranjen v temnem in hladnem prostoru (T < 6 °C).

### 3.1.2.1 Priprava preparata

$\beta$ -ciklodekstrin monohidrat ( $\beta$ CD×H<sub>2</sub>O; Aldrich, W402826) je bil raztopljen v 2,25 ml destilirane vode (76 °C). Sledil je dodatek 500  $\mu$ l raztopine koencima Q<sub>10</sub> (M = 863,4; Sigma, C9538) v dioksanu (Aldrich, 296309). Epruveta z vsebino je bila za 2,5 ure prenesena v ultrazvočno kopel (65 °C), potem pa postavljena v vodno kopel (65 °C), kjer se je postopno ohladila na sobno temperaturo. Sledilo je filtriranje nastale suspenzije skozi membrano (velikost por: 0,45  $\mu$ m). Po filtraciji in počasnem izhlapevanju (24 ur) je prišlo do oblikovanja kristalov (Prošek in sod., 2004).



**Slika 16:** Shema kompleksa  $\beta$ -ciklodekstrina in koencima Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>- $\beta$ CD) (Prošek in sod., 2004).

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Določanje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v koži in maščobi

V dimetrijevo steklenico smo zatehtali vzorec kože oziroma maščobe in dodali 0,5 M raztopino NaCl (Merck, 1.06404) (v vodi) v razmerju 2 : 1. Sledila je 5-minutna homogenizacija z ultra-turraxom (Ultra-turrax T25 in nastavkom S25N-18G; IKA, Nemčija). Vzorec je bilo med homogenizacijo potrebno hladiti v ledeni kopeli. Odtehtali smo 4,5 g ( $\pm$  0,001 g) homogenata v 50 ml centrifugirko (Sarstedt, 62.548.004) in dodali 15 ml 0,5 M NaCl (Merck, 1.06404) (v vodi) s temperaturo 40 °C. Centrifugirke z vsebino smo 5 minut močno stresali, nato pa jih za 15 minut prenesli v ultrazvočno kopel (Bransonic 3510E-DTH, Branson, Nemčija) pri 40 °C. V vsako centrifugirko smo dodali 25 ml organskega topila dietiletra (Merck, 1.00921) in ponovno stresali 5 minut. Sledilo je 15-minutno tretiranje v ultrazvočni kopeli (Bransonic 3510E-DTH, Branson, Nemčija). Naslednja stopnja je bila centrifugiranje pri 1750  $\times$  g (Eppendorf, centrifuge 5810),

6 minut. Rezultat centrifugiranja je ločitev organske in vodne faze. 20 ml organske faze smo prenesli v 100 ml steklene bučke z okroglim dnom (Lenz, 3.0014.37). V centrifugirke (Sarstedt, 62.548.004) s preostalo vsebino smo ponovno dodali 25 ml dietiletra (Merck, 1.00921) in celoten postopek ekstrakcije ponovili še enkrat.

Po končani drugi ekstrakciji je sledilo odparevanje topila na vakuumskem rotavaporju (Büchi, Rotavapor R-114 z Vac® V-500, Švica) v dveh stopnjah (pogoji: 700 mbar, 40 °C, 15 min; 100 mbar, 40 °C, 10 min). Suh preostanek v bučki smo raztopili v 2 ml heksana (Merck, 1.04371). Vzorec je bil pripravljen za ekstrakcijo s trdno fazo (solid phase extraction – SPE).

#### *Ekstrakcija s trdno fazo (SPE) - Supelclean™ ENVI™ Florisil®*

Uporabili smo kolono Supelclean™ ENVI™ Florisil® (Supelco, 57053), ki smo jo najprej kondicionirali s 3 ml heksana (Merck, 1.04371) (eluat zavržemo). Nato smo na kolono uvajali ves predhodno pripravljen vzorec in pazili, da je le-ta počasi (2 ml/min) potoval skozi kolono (eluat zavržemo). Sledilo je izpiranje kolone s 3 ml raztopine heksan (Merck, 1.04371) : diklorometan (Merck, 1.6044) (4 : 1). Eluat smo zbirali v čisto epruveto, na koncu pa kolono osušili v pretoku zraka. Topilo smo odparili s prepohovanjem v toku dušika, v epruveto dodali 5 ml 2-propanola (Merck, 1.00998) in dobro premešali na stresalniku (IKA minshaker MS2). Sledilo je redčenje ( $R = 50$ ); v majhne viale smo prenesli 20 µl predhodno pripravljenega vzorca in dodali 980 µl 2-propanola (Merck, 1.00998). Vzorci so bili pripravljeni za nadaljnje analize s tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masnim spektrometrom (LC-MS).

##### 3.2.1.1 Pogoji določanja vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> z LC-MS

Vsebnost koencima Q<sub>10</sub> smo določili s HPLC sistemom Agilent 1100, sestavljenim iz binarne gradientne črpalke (Agilent 1100, G1312A), vakuumskega razplinjevalnika (Agilent 1100, G1379A), avtomatskega podajalnika (Agilent 1100, G1330B) in termostata za kolono (Agilent 1100, G1316A). Uporabili smo kolono Gemini C18 (3 µm, 150 mm × 2 mm i.d.) firme Phenomenex (Torrance, CA, ZDA, 00F-4439-B0). Vsebnost koencima Q<sub>10</sub> smo določili s primerjavo retensijskega časa in m/z ([M+H]<sup>+</sup> = 864,4) standarda koencima Q<sub>10</sub> (Sigma, C9538). Kromatografski pogoji: pretok 0,25 ml/min; izokratsko z mešanico mobilne faze acetonitril (Merck, 1.00030) : 2-propanol (Merck, 1.00998) (60 : 40); volumen injiciranja je bil 15 µl, kromatografija je potekala pri 25 °C.

Kot detektor smo uporabili masni spektrometer (Micromass Quattro micro® API, Waters, ZDA) z elektrorazpršilno ionizacijo (electrospray ionization – ESI). Deloval je pri naslednjih pogojih: napetost vhodne leče 63 V, temperatura izvora 120 °C in napetost kapilare 4,0 kV v pozitivnem načinu ionizacije (ESI<sup>+</sup>). Razpršilni plin dušik je imel temperaturo 350 °C in pretok 400 l/h. Plin vhodne leče dušik je imel pretok 50 l/h.

Detekcija na masnem detektorju je potekala v SIR (Selected Ion Recording) načinu pri m/z = 864,4 [M+H].

### 3.2.1.2 Priprava umeritvenih krivulj

Za kvantitativno določanje koencima Q<sub>10</sub> z LC-MS smo uporabili standard Sigma (C9538).

#### *Priprava standardne raztopine koencima Q<sub>10</sub>*

V 10 ml bučko smo odtehtali 0,5 mg ( $\pm 0,01$  mg) standarda koencima Q<sub>10</sub> (Sigma, C9538) in dopolnili s heksanom (Merck, 1.04371) do oznake (ST1). Standard ST2 smo pripravili tako, da smo standard ST1  $100 \times$  razredčili.

#### **Umeritvena krivulja 1**

Različne volumne (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100  $\mu$ l) predhodno pripravljene standardne raztopine koencima Q<sub>10</sub> (ST2;  $c = 0,62 \mu\text{g/ml}$ ) smo odpipetirali v viale in jih z 2-propanolom (Merck, 1.00998) dopolnili do 1 ml. Na ta način smo preverili linearnost analitskega instrumenta za preiskovano območje.

#### **Umeritvena krivulja 2**

Vpliv matriksa analiziranega vzorca na analitski instrument in detekcijo smo preverili tako, da smo v vsako vialo odpipetirali po 20  $\mu$ l istega vzorca (kože oz. maščobe), pripravljenega za analizo na LC-MS. Sledil je dodatek različnih volumnov (0, 40, 80, 120, 160, 200  $\mu$ l) predhodno pripravljene standardne raztopine koencima Q<sub>10</sub> (ST2;  $c = 0,62 \mu\text{g/ml}$ ). Viale smo na koncu dopolnili z 2-propanolom (Merck, 1.00998) do 1 ml.

#### **Umeritvena krivulja 3**

V vzorce (kože oz. maščobe) smo odpipetirali različne volumne (0, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu$ l) standardne raztopine koencima Q<sub>10</sub> (ST1;  $c = 62 \mu\text{g/ml}$ ) in naprej postopali enako kot z vzorci (metoda standardnega dodatka).

*Izračun vsebnosti koencima Q<sub>10</sub>:*

$$C_{Q10} (\mu\text{g/g}) = \frac{A_{Q10}}{F_{um3} \times m_{vz}} \times 100$$

A<sub>Q10</sub> = površina pod vrhom za koencim Q<sub>10</sub> v vzorcu

F<sub>um3</sub> = faktor naklona umeritvene krivulje 3 (metoda standardnega dodatka); različen za kožo in maščobo.

m<sub>vz</sub> = masa vzorca (koža oz. maščoba) v g

### 3.2.1.3 Ponovljivost metode

**Ponovljivost med paralelkami** smo določili tako, da smo v naključno izbranem vzorcu kože oz. maščobe določili vsebnost koencima Q<sub>10</sub> v šestih paralelkah.

Določili smo tudi **ponovljivost znotraj paralelke**. Na naključno izbranem vzorcu kože oz. maščobe smo izvedli ekstrakcijo ter tako pripravljen vzorec 6-krat zaporedoma injicirali v LC-MS sistem.

Ponovljivost smo ovrednotili z določitvijo koeficiente variabilnosti (KV).

### 3.2.1.4 Linearnost metode

O linearnosti metode govorimo, če je v določenem koncentracijskem območju med koncentracijo komponente v vzorcu in odzivom zveza  $y = kx + n$  linearja.

Linearnost metode smo določili s pripravo treh različnih umeritvenih krivulj ter jo ovrednotili s Pearsonovim korelačijskim koeficientom ( $R^2$ ):

- **umeritvena krivulja 1** – linearnost instrumenta;
- **umeritvena krivulja 2** – linearnost vpliva matriksa;
- **umeritvena krivulja 3** – linearnost vpliva postopka in matriksa.

### 3.2.1.5 Meja detekcije in kvantifikacije

Z računalniškim programom (MassLynx™ V4,0) smo po metodi 'Peak-to-Peak' določili razmerje ('signal to noise' – S/N) med signalom in šumom opazovanega koencima Q<sub>10</sub>. Mejo detekcije in kvantifikacije smo določili kot vsebnost opazovanega koencima Q<sub>10</sub> v vzorcu kože oz. maščobe, pri kateri je razmerje S/N = 3 (detekcije) oz. S/N = 10 (kvantifikacije).

## 3.2.2 Določanje vsebnosti holesterola

### 3.2.2.1 V koži

Za določanje holesterola smo uporabili modificirano metodo po Naeemi-ju (Naeemi in sod., 1995). Vsebnost holesterola smo kvantitativno določili z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC).

#### *Saponifikacija in ekstrakcija*

Odtehtali smo 4,5 g ( $\pm 0,001$  g) predhodno homogeniziranega vzorca kože (masa vzorca : masa NaCl (Merck, 1.06404) = 2 : 1) v 100 ml stekleno erlenmajerico s teflonskim pokrovčkom (Lenz, 3.0251.37). Dodali smo 5 ml destilirane vode, 15 ml 50 % KOH (Merck, 1.05033) (v vodi) ter 10 ml 96 % etanola (Merck, 1.00971). Vse skupaj smo segrevali 15 minut pri 60 °C na elektromagnetnem mešalniku RT 10 power IKAMAG® (IKA, 2930500). Erlenmajerico z nastalo bistro raztopino smo ohladili na sobno temperaturo in vsebino prelili v 50 ml centrifugirko (Sarstedt, 62.548.004). Erlenmajerico

smo sprali z 10 ml 96 % etanola (Merck, 1.00971). Dodali smo 10 ml ( $\pm 0,01$  ml) heksana (Merck, 1.04371) in 2 minuti močno stresali. Sledilo je 10-minutno centrifugiranje pri  $1000 \times g$  (Eppendorf, centrifuge 5810). Po centrifugiraju smo odpipetirali 5 ml ( $\pm 0,01$  ml) heksanske faze v vialo (Supelco, 27002-U) in heksan odparili s prepihovanjem v toku dušika. Suh preostanek je bil tako pripravljen za SPE (ekstrakcija s trdno fazo).

#### *Ekstrakcija s trdno fazo (SPE)*

Uporabili smo kolono Strata Si-1 (Phenomenex; 8B-S012-EAK), ki smo jo najprej kondicionirali s 3 ml heksana (Merck, 1.04371) (eluat zavržemo), nato pa nanjo uvajali ves suhi ostanek vzorca, ki smo ga predhodno raztopili v 2 ml mešanice heksan (Merck, 1.04371) : dietileter (Merck, 1.00921) (75 : 25). Pazili smo, da je le-ta počasi potoval (2 ml/min) skozi kolono zaradi boljše vezave holesterola (eluat zavržemo). Sledilo je spiranje neželenih komponent s 3 ml heksana (Merck, 1.04371) in 3 ml raztopine heksan (Merck, 1.04371) : dietileter (Merck, 1.00921) (75 : 25) (eluat zavržemo). Nato smo kolono osušili v pretoku zraka. Na koncu smo jo sprali z 2 ml mobilne faze acetonitril (Merck, 1.00030) : 2-propanol (Merck, 1.00998) (55 : 45) in eluat lovili v epruveto. Vzorec je bil pripravljen za analizo na HPLC.

#### 3.2.2.2 V maščobi

Odtehtali smo 1 g ( $\pm 0,001$  g) predhodno homogeniziranega vzorca maščobe (masa vzorca : masa 0,5 M NaCl (Merck, 1.06404) = 2 : 1) v 100 ml stekleno erlenmajerico s teflonskim pokrovčkom (Lenz, 3.0251.37), dodali 15 ml destilirane vode, 15 ml 50 % KOH (Merck, 1.05033) v vodi in 5 ml 96 % etanola (Merck, 1.00971). Vse skupaj smo segrevali 15 minut pri 60 °C na elektromagnetskem mešalniku RT 10 power IKAMAG® (IKA, 2930500). Erlenmajerico z nastalo bistro raztopino smo ohladili na sobno temperaturo, vsebino prelili v 50 ml centrifugirko (Sarstedt, 62.548.004) in erlenmajerico sprali s 5 ml 96 % etanola (Merck, 1.00971). Nadaljnje faze so bile enake kot pri določanju holesterola v koži.

#### 3.2.2.3 Pogoji določanja vsebnosti holesterola s HPLC

Vsebnost holesterola smo določili s HPLC sistemom Agilent 1100, sestavljenem iz binarne gradientne črpalke (Agilent 1100, G1312A), vakuumskega razplinjevalnika (Agilent 1100, G1379A), avtomatskega podajalnika (Agilent 1100, G1330B) in termostata za kolono (Agilent 1100, G1316A). Uporabili smo kolono Gemini C18 (3 µm, 150 mm × 2 mm i.d.) firme Phenomenex (Torrance, CA, ZDA, 00F-4439-B0). Vsebnost holesterola smo določili s primerjavo retenzijskega časa in absorpcijskega spektra standarda holesterola (Sigma, C-8667). Kromatografski pogoji: pretok: 0,25 ml/min; izokratsko z mešanicu mobilne faze acetonitril (Merck, 1.00030) : 1 % mravljična kislina (Merck, 1.00264) v 2-propanolu

(Merck, 1.00998) (60 : 40); volumen injiciranja: 20 µl, kromatografija je potekala pri 25 °C.

Kot detektor smo uporabili DAD (Diode Array Detector) (Agilent 1100, G1315A) z območjem skeniranja od 200 nm do 400 nm. Kvantifikacija je potekala pri valovni dolžini 210 nm.

### 3.2.2.4 Priprava umeritvene krivulje

#### *Priprava standardne raztopine holesterola*

V 10 ml bučko smo odtehtali 20 mg (± 0,01 mg) standarda holesterola (Sigma, C-8667) in dopolnili s heksanom (Merck, 1.04371) do oznake (c = 1,758 mg/ml).

#### *Umeritvena krivulja po metodi standardnega dodatka*

V vzorce (kože oz. maščobe) smo odpipetirali različne volumne (0, 100, 200, 300, 400, 500 µl) standardne raztopine holesterola in naprej postopali enako kot z vzorci.

#### *Izračun vsebnosti holesterola:*

$$C_{hol}(\text{mg}/100\text{g}) = \frac{A_{hol}}{F_{um3} \times m_{vz}} \times 100$$

A<sub>hol</sub> = površina pod vrhom za holesterol v vzorcu

F<sub>um3</sub> = faktor naklona umeritvene krivulje 3 (metoda standardnega dodatka); različen za kožo in maščobo

m<sub>vz</sub> = masa vzorca (koža oz. maščoba) v g

### 3.2.2.5 Ponovljivost metode

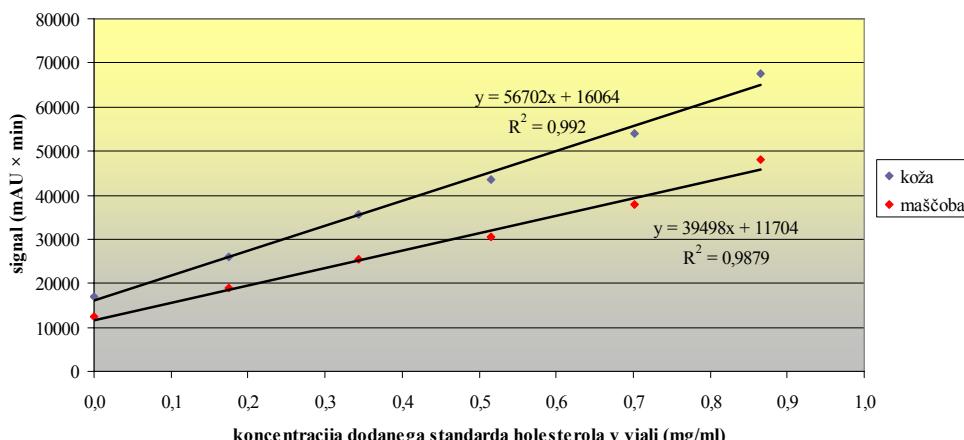
**Ponovljivost med paralelkami** smo določili tako, da smo v naključno izbranem vzorcu kože oz. maščobe določili vsebnost holesterola v šestih paralelkah. Ponovljivost smo ovrednotili s koeficientom variabilnosti (KV), ki je znašal 4,57 % za kožo in 4,98 % za maščobo.

Določili smo tudi **ponovljivost znotraj paralelke**. Na naključno izbranem vzorcu kože oz. maščobe smo izvedli postopek za določanje holesterola ter tako pripravljen vzorec 6-krat zaporedoma injicirali v HPLC sistem. Ponovljivost smo ovrednotili s koeficientom variabilnosti (KV), ki je znašal 1,29 % za kožo in 1,38 % za maščobo.

### 3.2.2.6 Linearnost metode

O linearnosti metode govorimo, če je v določenem koncentracijskem območju med koncentracijo komponente v vzorcu in odzivom zveza  $y = kx + n$  linearja.

Linearnost metode smo določili s pripravo **umeritvene krivulje s standardnim dodatkom** in jo ovrednotili s Pearsonovim korelacijskim koeficientom ( $R^2$ ).



**Slika 17: Umeritvena krivulja za holesterol v koži in maščobi.**

### 3.2.3 Določanje maščobnokislinske sestave kože in maščobe

Maščobnokislinsko sestavo kože in maščobe smo določili z metodo, modificirano po Park in Goinsu (1994).

Odtehtali smo 0,2 g ( $\pm 0,001$  g) predhodno homogeniziranega vzorca kože oziroma maščobe (masa vzorca : masa NaCl (Merck, 1.06404) = 2 : 1) v epruvete s pokrovčki na navoj (Assistant, 976). Sledil je dodatek 300 µl metilen klorida ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; Merck, 1.06044) in 3 ml 0,5 M sveže pripravljenega natrijevega hidroksida (NaOH; Merck, 1.06498) v metanolu (Merck, 1.06007). Epruvete smo tesno zaprli s teflonskim pokrovčkom in jih dobro premešali. Vzorce smo segrevali v termobloku (VLM EC1) 10 minut pri 90 °C ter jih vmes večkrat premešali. Po segrevanju je sledilo hitro hlajenje v ledeni vodi (0 °C). Ohlajeni zmesi smo dodali 3 ml 14 %  $\text{BF}_3$  (Sigma, B1252) v metanolu (Merck, 1.06007), dobro premešali in ponovno segrevali v termobloku (VLM EC1) 10 minut pri 90 °C. Sledilo je hlajenje na sobno temperaturo (23 °C), dodatek 3 ml 10 % NaCl (Merck, 1.06404) v vodi in 2 ml heksana (Merck, 1.04371). Epruvete smo nato 1 minuto močno stresali, da je prišlo do čim boljše ekstrakcije metilnih estrov maščobnih kislin (MEMK) iz vodne v nepolarno, heksansko fazo. Sledilo je centrifugiranje 10 minut pri 2000 × g (Eppendorf, centrifuge 5810). Po centrifugirjanju smo previdno odpipetirali zgornjo heksansko fazo v temne penicilinke in 1 µl injicirali v plinski kromatograf s plamensko ionizacijskim detektorjem (GC-FID).

### *Plinska kromatografija*

Vsebnost in deleže posameznih maščobnih kislin smo določili s plinsko kromatografijo na plinskem kromatografu Agilent Technologies 6890, s plamensko ionizacijskim detektorjem (FID). Uporabili smo kapilarno kolono SP<sup>TM</sup>-2380 (Supelco, 24111) (60 m × 0,25 mm × 0,2 µm).

Temperaturni program za ločevanje in detekcijo: 150 °C (4 min); 4 °C/min do 180 °C (5 min), 3 °C/min do 240 °C (2 min); temperatura injektorja 250 °C; injektor: split:splitless = 1:30, volumen 0,5 µl; temperatura detektorja FID 280 °C; nosilni plin: He (čistost 6) 2,3 ml/min; maskirni plin: N<sub>2</sub> (čistost 6) 45 ml/min; plina detektorja: H<sub>2</sub> (čistost 6) 40 ml/min; sintetični zrak (čistost 6) (21 % O<sub>2</sub>) 450 ml/min.

Za določitev in izvrednotenje rezultatov smo uporabili naslednje standarde MEMK: standardno mešanico NuChehk 85 Prep. Inc, standardno mešanico NuChehk 68 D Prep. Inc. ter standardno mešanico FAME Mix C4-C24 (Supelco, 18919-1AMP).

### *Določanje faktorja odzivnosti (Rf) plamensko ionizacijskega detektorja (FID)*

Za natančno kvantitativno ovrednotenje kromatogramov je treba določiti faktor odzivnosti detektorja (Rf). Določimo ga s standardno mešanico (Nu Check 85 Prep. Inc), kjer so znani utežni % posameznih maščobnih kislin.

Račun:

$$Rf = \frac{ut.\%_{posam.MEMK} \times \sum_{i=1}^n A_i}{A_i \times 100 ut.\%}$$

A<sub>i</sub> = površina posameznega MEMK-standarda

ut. % posameznih metilnih estrov maščobnih kislin v Nu Check 85 Prep. Inc znaša 3,03, razen za metilne estre heksadekanojske (palmitinske) maščobne kisline, kjer znaša 6,06.

### *Določanje konverzijskega faktorja (FA<sub>i</sub>) za posamezno MK*

Faktor za pretvorbo MEMK v MK (FA<sub>i</sub>) smo določili po naslednji formuli:

Račun:

$$FA_i = \frac{MrMK_i}{MrMEMK_i} = \frac{MrMK_i}{MrMK_i + 14}$$

MrMK<sub>i</sub> = molska masa posamezne maščobne kisline

MrMEMK<sub>i</sub> = molska masa posameznega metilnega estra maščobnih kislin, ki se od MrMK<sub>i</sub> razlikuje za Mr (CH<sub>2</sub>) skupine = 14

*Izračun utežnih deležev maščobnih kislin (ut %)*

Utežni delež maščobnih kislin v vzorcu smo izračunali iz relativne površine vrha posamezne maščobne kisline na kromatogramu ( $A_i$ ) in upoštevanjem faktorja odzivnosti detektorja ( $Rf_i$ ) ter konverzijskega faktorja ( $FA_i$ ) pretvorbe MEMK v MK.

Račun:

$$ut.\% MK = \frac{(Rf_i \times FA_i \times A_i)}{\sum_{i=1}^n (Rf_i \times FA_i \times A_i)} \times 100$$

$A_i$  = površina posamezne maščobne kisline

$Rf_i$  = faktor odzivnosti detektorja za posamezno maščobno kislino

$FA_i$  = konverzijski faktor za posamezno maščobno kislino

### 3.2.4 Statistična analiza

V poizkusu zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Tako urejene podatke smo statistično obdelali z računalniškim programom SAS (SAS Software. Version 8.01, 1999) z multiplo analizo variance – postopkom GLM (General Linear Models).

Statistični model za vsebnost Q<sub>10</sub>, holesterola in maščobnokislinsko sestavo v piščančji koži in maščobi je vključeval vpliv različnega dodatka Q<sub>10</sub>.

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + T_j + D * T_{ij} + e_{ijk}$$

$y_{ijk}$  = ijk-to opazovanje;

$\mu$  = povprečna vrednost;

$D_i$  = vpliv dodatka Q<sub>10</sub> (kontrola, S10, S20, S30, S40);

$T_j$  = vpliv tkiva (piščančja koža, maščoba);

$e_{ijk}$  = ostanek.

Pričakovane povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo Duncanovega testa in primerjane pri 5 % tveganju. Pearsonovi korelacijski koeficienti med merjenimi parametri so bili izračunani s postopkom PROC CORR (SAS Software, 1999).

## 4 REZULTATI

### 4.1 RAZVOJ ANALITSKE METODE

#### 4.1.1 Začetna metoda Kemijskega inštituta

Koencim Q<sub>10</sub> v koži in maščobi smo poskušali določiti z metodo, ki so jo razvili na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, v Laboratoriju za prehrambeno kemijo (Fir in sod., 2008). Metoda se je izkazala kot primerna za določanje koencima Q<sub>10</sub> v mišičnini z vsebnostjo maščob do 30 %.

##### *Postopek ekstrakcije*

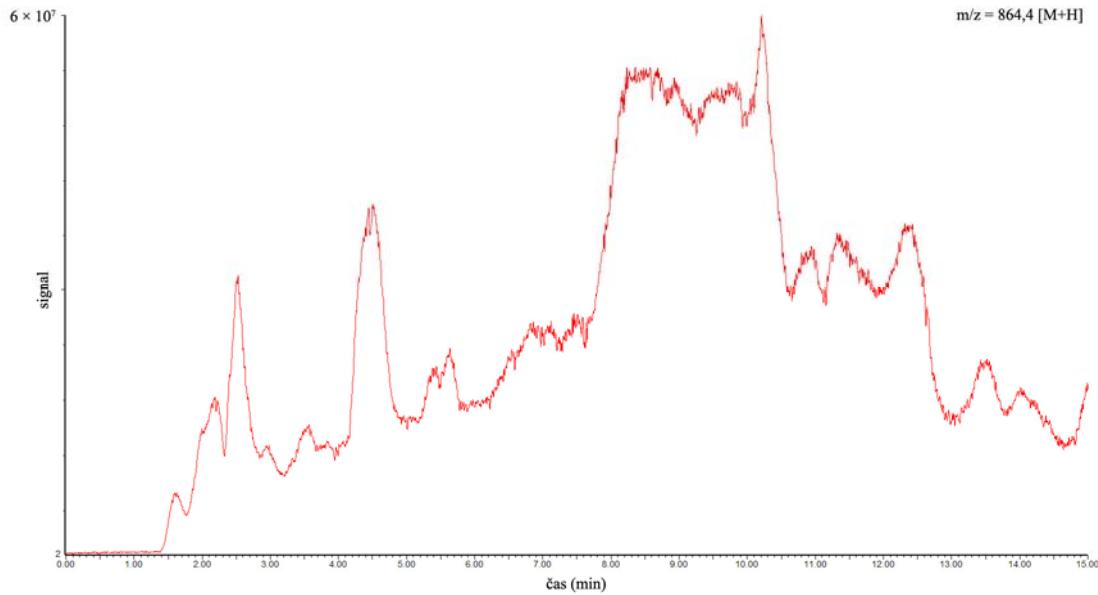
V dimetrijevo steklenico smo zatehtali vzorec kože oziroma maščobe ter dodali destilirano vodo v razmerju 1 : 2. Sledila je 5-minutna homogenizacija z ultra-turraxom (Ultra-turrax T25 in nastavkom S25N-18G; IKA, Nemčija). V 50 ml centrifugirko (Sarstedt, 62.548.004) smo odtehtali 3 g ( $\pm 0,001$  g) homogenata in dodali 15 ml destilirane vode, segrete na 40 °C. Tako pripravljene vzorce smo 5 minut intenzivno stresali, nato pa jih za 15 minut prenesli v ultrazvočno kopel (Bransonic 3510E-DTH, Branson, Nemčija). V vsako centrifugirko smo dodali 20 ml ekstrakcijskega topila kloroform (Merck, 1.02445) : metanol (Merck, 1.06007) = 2 : 1 in ponovno intenzivno stresali 5 minut ter pustili na ultrazvočni kopeli 15 minut (Bransonic 3510E-DTH, Branson, Nemčija). Sledilo je 6-minutno centrifugiranje pri  $1750 \times g$  (Eppendorf, centrifuge 5810). Rezultat centrifugiranja je ločitev organske in vodne faze. 10 ml organske faze smo prenesli v 100 ml bučke (Lenz, 3.0014.37). V centrifugirke (Sarstedt, 62.548.004) s preostalo vsebino smo ponovno dodali 20 ml ekstrakcijskega topila kloroform (Merck, 1.02445) : metanol (Merck, 1.06007) = 2 : 1 ter celoten postopek ekstrakcije ponovili še enkrat.

Po končani drugi ekstrakciji je sledilo odparevanje topila na vakuumskem rotavaporju (Büchi, Rotvapor R-114 z Vac® V-500, Švica) v dveh stopnjah (pogoji: 700 mbar, 40 °C, 15 min; 100 mbar, 40 °C, 10 min). Suh preostanek v bučkah (Lenz, 3.0014.37) smo raztopili v 2 ml heksana (Merck, 1.04371) ter premešali na stresalniku (IKA minshaker MS2). Vsebino smo prenesli v viale (Supelco, 27002-U) in topilo odparili s prepihovanjem v toku dušika.

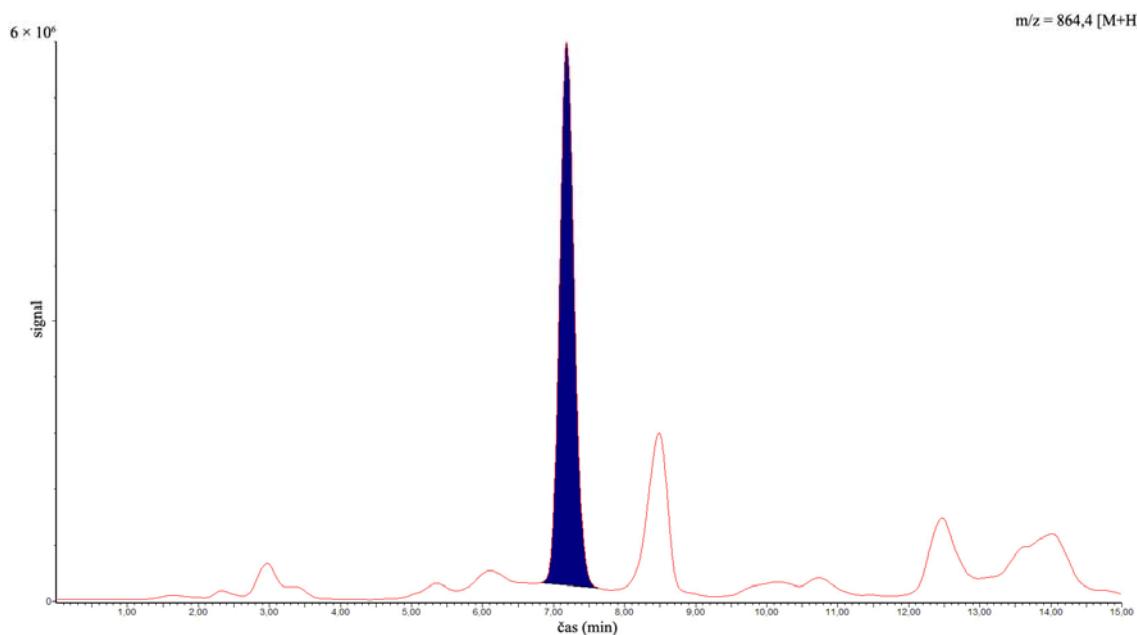
Pred analizo na LC-MS smo suh preostanek v vialah raztopili v 5 ml 2-propanola (Merck, 1.00998), premešali na stresalniku (IKA minshaker MS2) ter ustrezno razredčen ( $R = 50$ ) vzorec injicirali v LC-MS sistem.

Rezultate LC-MS analize vzorca kože prikazuje kromatogram (slika 18). Do podobnih rezultatov smo prišli tudi pri maščobi.

Za primerjavo je prikazan tudi kromatogram (slika 19) vzorca srca, pripravljenega po isti metodi kot naši vzorci.



**Slika 18: Kromatogram vzorca kože pripravljenega po metodi (poglavlje 4.1.1) brez SPE.**



**Slika 19: Kromatogram vzorca srca pripravljenega po metodi (poglavlje 4.1.1) brez SPE.**

#### 4.1.2 Različne poti razvoja nove metode

Opisana metoda se ni izkazala za uspešno. Težave so nastopile že pri sami homogenizaciji vzorca (koža in maščoba) z ultra turraksom. Največji problem je zaradi svoje narave (velike količine veziva) povzročala koža. Destilirano vodo je bilo potrebno v procesu homogenizacije nadomestiti z učinkovitejšim topilom; preizkusili smo 0,5 M raztopino KOH v vodi oz. etanolu ter 0,5 M raztopino NaCl v vodi.

Prav tako smo ekstrakcijsko topilo kloroform, predvsem zaradi njegove škodljive narave za zdravje, želeli nadomestiti z manj škodljivim in primerno učinkovitim topilom. V ta namen smo izvedli celoten postopek ekstrakcije z uporabo različnih kombinacij topil. Različna topila in rezultati ekstrakcije so prikazani v preglednici 5.

**Preglednica 5: Postopek in rezultati uporabe različnih homogenizacijskih in ekstrakcijskih topil.**

Vzorec	KOH / NaCl	ekstrakcijsko topilo	rezultati ekstrakcije
koža	0,5 M KOH v vodi	kloroform	obe fazi sta motni; slaba ločitev faz
koža	0,5 M KOH v vodi	dietileter	motnost; slaba ločitev faz
koža	0,5 M KOH v vodi	heksan	motnost; uspešna ločitev faz
koža	0,5 M KOH v etanolu	kloroform	motnost; uspešna ločitev faz
koža	<b>0,5 M KOH v etanolu</b>	<b>dietileter</b>	<b>obe fazi sta bistri; uspešna ločitev faz</b>
koža	0,5 M KOH v etanolu	heksan	motnost organske faze; uspešna ločitev faz
koža	0,5 M NaCl v vodi	kloroform	motnost; uspešna ločitev faz
koža	<b>0,5 M NaCl v vodi</b>	<b>dietileter</b>	<b>bistrost faz; uspešna ločitev</b>
koža	0,5 M NaCl v vodi	heksan	motnost; nastanejo tri faze
maščoba	0,5 M KOH v vodi	kloroform	motnost; slaba ločitev faz
maščoba	0,5 M KOH v vodi	dietileter	motnost; slaba ločitev faz
maščoba	0,5 M KOH v vodi	heksan	motnost; uspešna ločitev faz
maščoba	0,5 M KOH v etanolu	kloroform	motnost; uspešna ločitev faz
maščoba	<b>0,5 M KOH v etanolu</b>	<b>dietileter</b>	<b>bistrost; uspešna ločitev faz</b>
maščoba	0,5 M KOH v etanolu	heksan	motnost organske faze; uspešna ločitev faz
maščoba	0,5 M NaCl v vodi	kloroform	motnost; uspešna ločitev faz
maščoba	<b>0,5 M NaCl v vodi</b>	<b>dietileter</b>	<b>bistrost; uspešna ločitev faz</b>
maščoba	0,5 M NaCl v vodi	heksan	nastanek treh faz

Za najučinkovitejše ekstrakcijsko topilo, tako pri koži kot tudi pri maščobi, se je izkazal dietileter (Merck, 1.00921), po predhodni homogenizaciji vzorca z 0,5 M raztopino KOH (Merck, 1.05033) v etanolu oz. 0,5 M raztopino NaCl (Merck, 1.06404) v vodi. Prednost v uporabi dietiletra za razliko od kloroforma je tudi v tem, da v procesu ekstrakcije

predstavlja zgornjo fazo ter nam s tem olajša delo pri odvzemu organske faze iz centrifugirke.

Tako pripravljene vzorce smo analizirali na LC-MS. Na osnovi rezultatov, ki so pokazali negativen vpliv raztopine KOH na koencim Q<sub>10</sub> v analiziranem vzorcu, smo se odločili za uporabo 0,5 M raztopine NaCl.

Ponovno smo izvedli proces ekstrakcije, kjer smo vzorec kože oz. maščobe homogenizirali z 0,5 M raztopino NaCl (Merck, 1.06404), v razmerju 2 : 1 (vzorec : NaCl). Kot ekstrakcijsko topilo pa smo uporabili dietileter (postopek ekstrakcije opisan v poglavju 3.2.1).

V tako pripravljenih vzorcih, analiziranih na LC-MS, je bilo opaznih preveč motečih komponent, kar je onemogočalo kvantifikacijo koencima Q<sub>10</sub>.

#### 4.1.2.1 Uporaba SPE

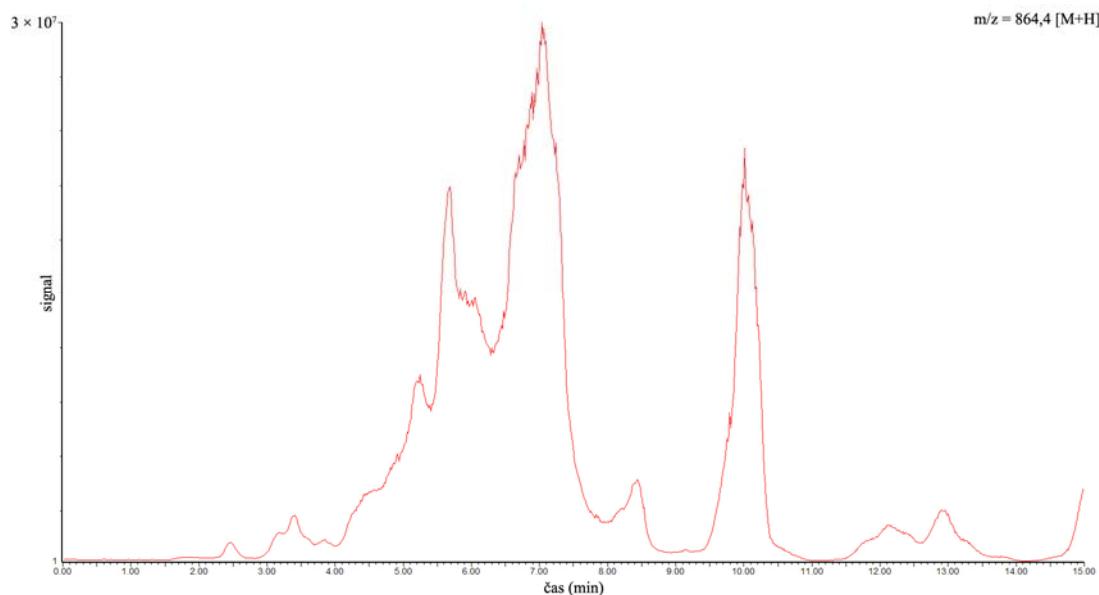
Na podlagi eksperimentalnih podatkov in kromatogramov smo sklepali, da naj bi bile glavne moteče komponente po polarnosti podobne koencimu Q<sub>10</sub>. V koži in adipoznem tkivu piščancev namreč prevladujejo lipidi, ki kažejo podobne fizikalne lastnosti kot koencim Q<sub>10</sub>.

Prišli smo do zaključka, da bi za uspešno kvantifikacijo koencima Q<sub>10</sub> bilo vzorec kože oz. maščobe potrebno očistiti. Odločili smo se za ekstrakcijo s trdno fazo (SPE). Uporabili smo kolono Strata Si-1 (Phenomenex; 8B-S012-EAK) z normalno fazo, ki se uporablja za ekstrakcijo nizko polarnih in polarnih spojin iz nepolarnih topil.

##### *Ekstrakcija s trdno fazo (SPE)*

Kolono Strata Si-1 (Phenomenex; 8B-S012-EAK) smo najprej kondicionirali s 3 ml heksana (Merck, 1.04371), nato pa nanjo uvajali ves suhi preostanek vzorca, ki smo ga predhodno raztopili v 3 ml heksana (Merck, 1.04371). Pazili smo, da je le-ta počasi potoval skozi kolono (zaradi boljše vezave koencima Q<sub>10</sub>) (eluat zavržemo). Sledilo je izpiranje kolone s 4 ml raztopine heksan (Merck, 1.04371) : dietileter (Merck, 1.00921) = 75 : 25. Eluat smo lovili v čisto epruveto ter na koncu kolono osušili v pretoku zraka.

Topilo smo odparili s prepihovanjem v toku dušika, v epruvete dodali 5 ml 2-propanola (Merck, 1.00998) in dobro premešali na stresalniku (IKA minshaker MS2). Po ustreznom redčenju ( $R = 50$ ) so bili vzorci injicirali v LC-MS sistem.



**Slika 20: Kromatogram vzorca kože pripravljenega po metodi, opisani v poglavju 4.1.2.1.**

Rezultati, ki smo jih dobili, prav tako niso zadovoljivi (slika 20). Sklepali smo, da v postopku SPE verjetno ni prišlo do vezave koencima Q<sub>10</sub> na kolono.

#### 4.1.2.2 SPE z uporabo Supelclean™ ENVI™ Florisil®

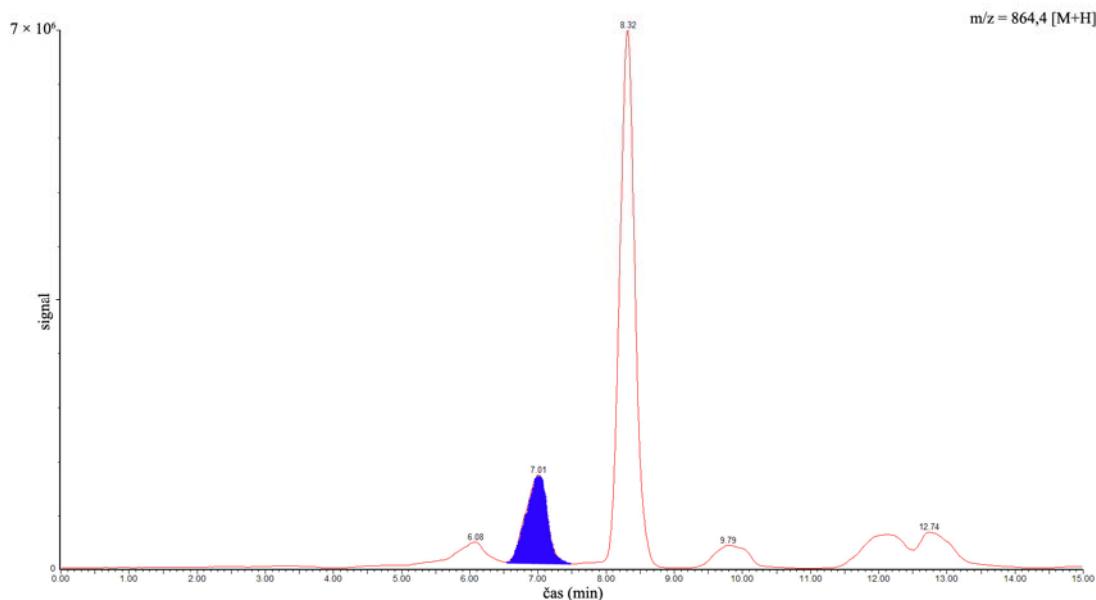
Pri iskanju rešitve, kako iz ekstrakta vzorca kože oz. maščobe odstraniti glavni moteči dejavnik – maščobo, smo v literaturi zasledili uporabo **florisila** v procesu določanja polikloriranih bifenilov (PCB), ki so, prav tako kot koencim Q<sub>10</sub>, maščobotopne komponente. Florisil naj bi namreč nase vezal maščobo ter tako omogočil njeno odstranitev iz vzorca.

Ponovno smo izvedli SPE postopek, le da smo prej uporabljeno kolono (Strata SI-1 (Phenomenex; 8B-S012-EAK)) nadomestili s kolono Supelclean™ ENVI™ Florisil® (Supelco, 57053).

#### *Ekstrakcija s trdno fazo (SPE) - Supelclean™ ENVI™ Florisil®*

Uporabili smo kolono Supelclean™ ENVI™ Florisil® (Supelco, 57053), ki smo jo najprej kondicionirali s 3 ml heksana (Merck, 1.04371) (eluat zavrzemo). Nato smo na kolono uvajali ves predhodno pripravljen vzorec in pazili, da je počasi (2 ml/min) potoval skozi kolono (eluat zavrzemo). Sledilo je izpiranje kolone s 3 ml raztopine heksan (Merck, 1.04371) : diklorometan (Merck, 1.6044) (4 : 1). Eluat smo zbirali v čisto epruveto, na koncu pa kolono osušili v pretoku zraka. Topilo smo odparili s prepohovanjem v toku dušika, v epruveto dodali 5 ml 2-propanola (Merck, 1.00998) in dobro premešali na stresalniku (IKA minshaker MS2). Sledilo je redčenje ( $R = 50$ ); v majhne viale smo

prenesli 20 µl predhodno pripravljenega vzorca in dodali 980 µl 2-propanola (Merck, 1.00998). Vzorci so bili pripravljeni za nadaljnje analize s tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masnim spektrometrom (LC-MS).



**Slika 21: Kromatogram vzorca kože pripravljenega po metodi, opisani v poglavju 3.2.1.**

Na osnovi rezultatov in kromatogramov (slika 21) smo ugotovili, da nam je z uporabo florisa uspelo odstraniti maščobo iz vzorca kože oz. maščobe ter tako kvantificirati koencim Q<sub>10</sub>.

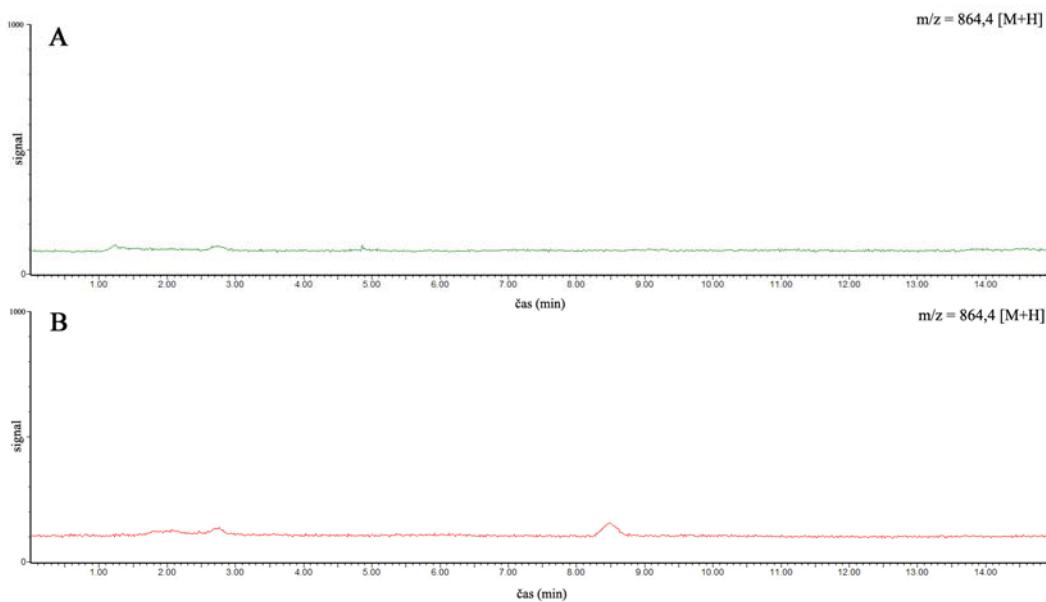
**Zaključimo lahko, da predstavlja florisol edinstveno rešitev pri določanju koencima Q<sub>10</sub> v maščobno bogatih tkivih.**

## 4.2 VALIDACIJA ANALITSKE METODE

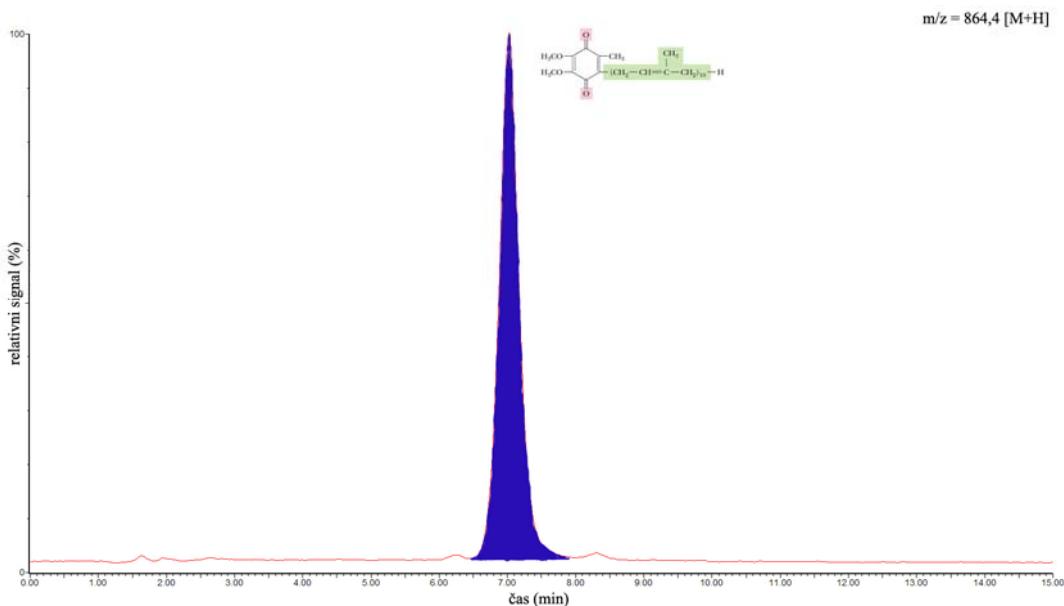
### 4.2.1 Selektivnost

Selektivnost oziroma specifičnost metode smo določili z zaporednim injiciranjem sledečih raztopin v LC-MS sistem:

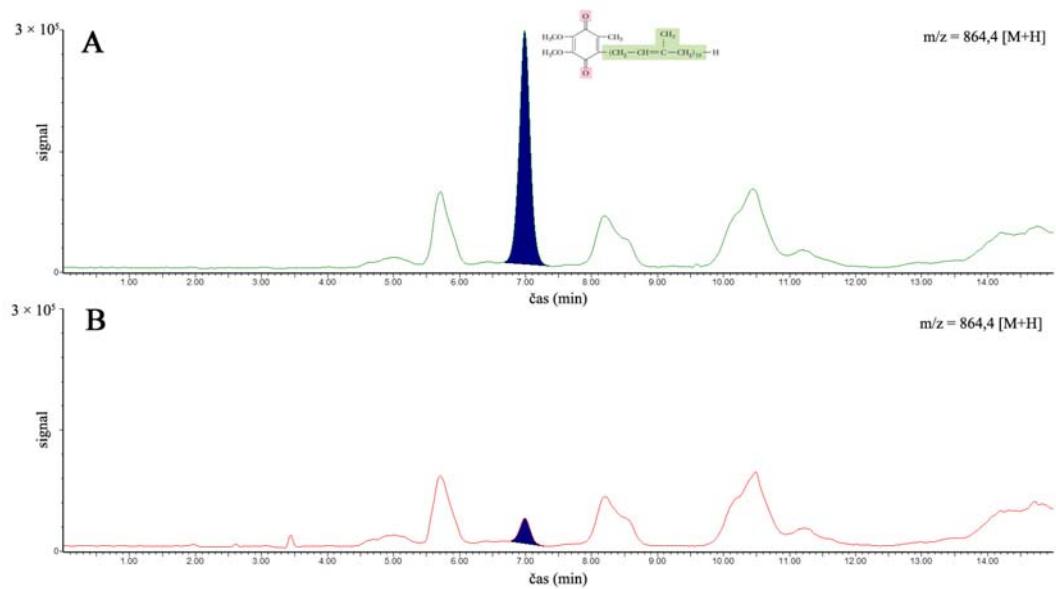
- mobilna faza (acetonitril (Merck, 1.00030) : 2-propanol (Merck, 1.00998) (60 : 40)) (slika 22 A);
- reagenti brez vzorca (slika 22 B);
- standardni dodatek koencima Q<sub>10</sub> (Sigma, C9538) (slika 23);
- vzorec kože oziroma maščobe + standardni dodatek koencima Q<sub>10</sub> (sliki 24 A in 25 A);
- vzorec kože oziroma maščobe (sliki 24 B in 25 B).



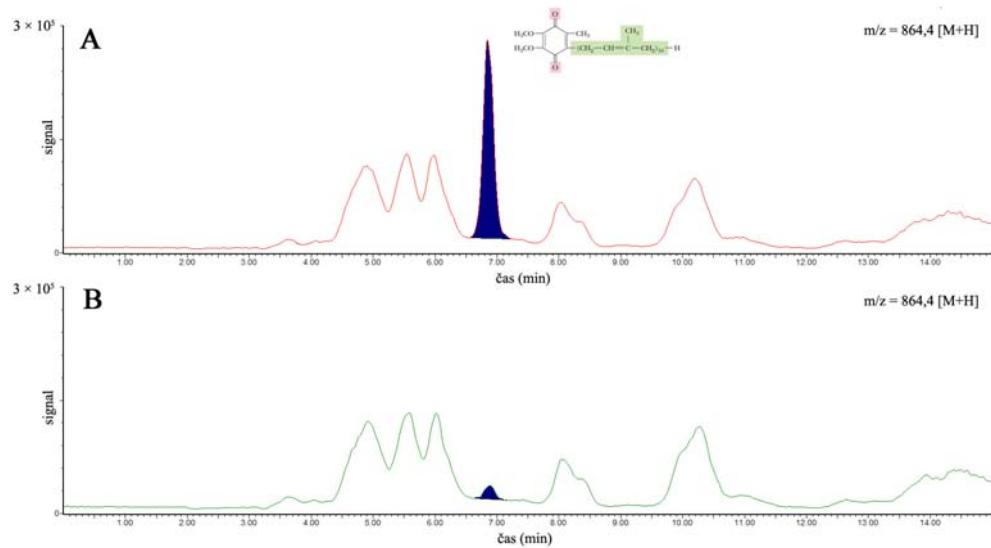
**Slika 22: Preverjanje signala: A – signal mobilne faze; B – signal reagentov brez vzorca (kromatografski pogoji opisani v poglavju 3.2.1.1).**



**Slika 23:** Signal standardnega dodatka koencima Q<sub>10</sub> (kromatografski pogoji opisani v poglavju 3.2.1.1).



**Slika 24:** Primerjava kromatogramov vzorca kože: A – vzorec kože s standardnim dodatkom koencima Q<sub>10</sub>; B – vzorec kože (kromatografski pogoji opisani v poglavju 3.2.1.1).



**Slika 25:** Primerjava kromatogramov vzorca maščobe: A – vzorec maščobe s standardnim dodatkom koencima Q<sub>10</sub>; B – vzorec maščobe (kromatografski pogoji opisani v poglavju 3.2.1.1).

#### 4.2.2 Ponovljivost

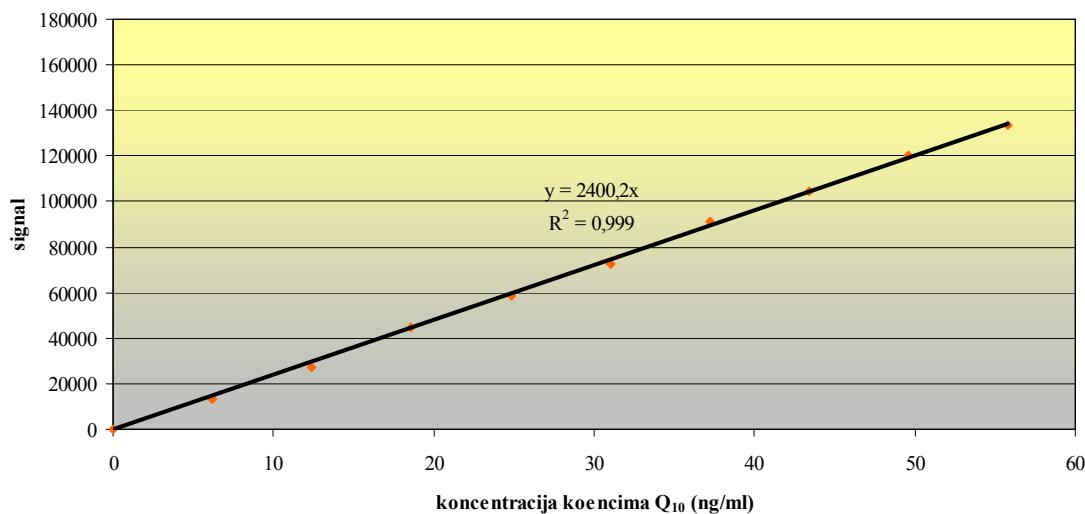
Preglednica 6: Ponovljivost znotraj in med paralelkami za kožo in maščobo ( $\mu\text{g/g}$ ).

Ponovitev	1.	2.	3.	4.	5.	6.	so	KV(%)
<b>koža</b>								
znotraj	11,21	11,35	11,45	11,12	11,02	11,78	0,27	2,41
med	10,54	11,21	11,19	11,57	9,74	12,13	0,55	4,89
<b>maščoba</b>								
znotraj	3,91	3,92	3,99	3,78	3,68	3,79	0,11	2,97
med	3,91	3,35	3,52	4,14	3,88	3,43	0,31	8,48

Na osnovi izračunanih KV lahko zaključimo, da je naša metoda ponovljiva tako znotraj paralelke kot tudi med paralelkami (preglednica 6). Nekoliko večji KV (8,48 %) smo dobili pri določanju vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v maščobi med paralelkami, kar je razumljivo, saj ga je po vsebnosti 3-krat manj kot v koži.

#### 4.2.3 Linearnost

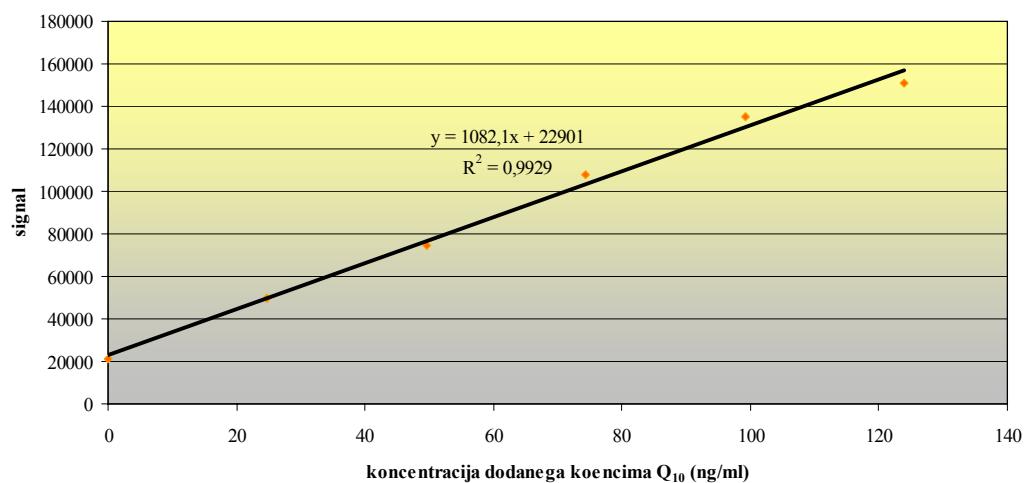
Linearnost instrumenta (LC-MS) za določanje koencima Q<sub>10</sub> smo preverili s pripravo **umeritvene krivulje 1**. Pearsonov koreacijski koeficient ( $R^2$ ) znaša 0,999 (slika 26). Na osnovi tega lahko zaključimo, da je delovanje instrumenta (LC-MS) v preiskovanem območju linearno.



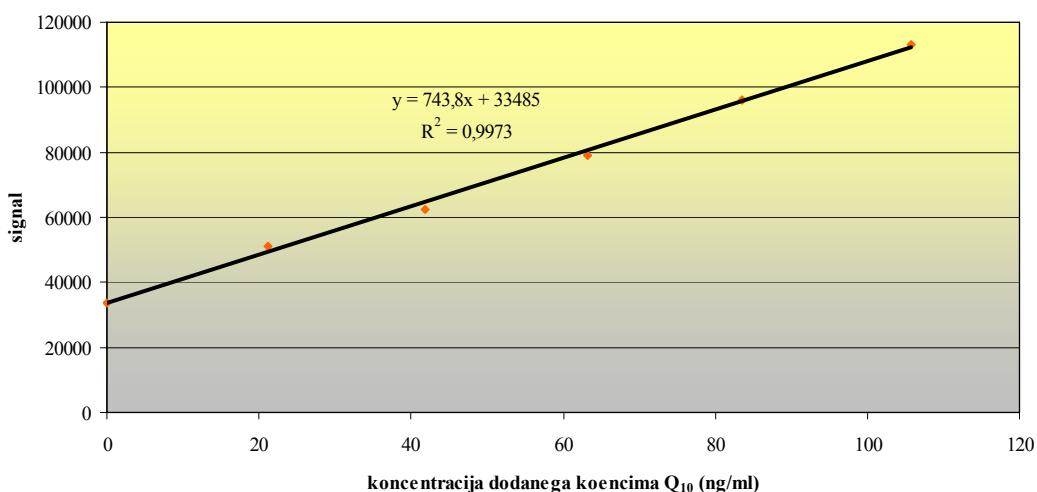
Slika 26: Umeritvena krivulja 1 – linearnost instrumenta (LC-MS) za koencim Q<sub>10</sub>.

#### 4.2.3.1 Umeritvene krivulje za kožo

Linearnost vpliva matriksa kože ter linearnost vpliva postopka in matriksa na signal koencima Q<sub>10</sub> smo preverili z **umeritvenima krivuljama 2 in 3**. Dobljeni Pearsonovi korelacijski koeficienti (slike 27 in 28) potrjujejo linearnost signala koencima Q<sub>10</sub> v preiskovanem območju.



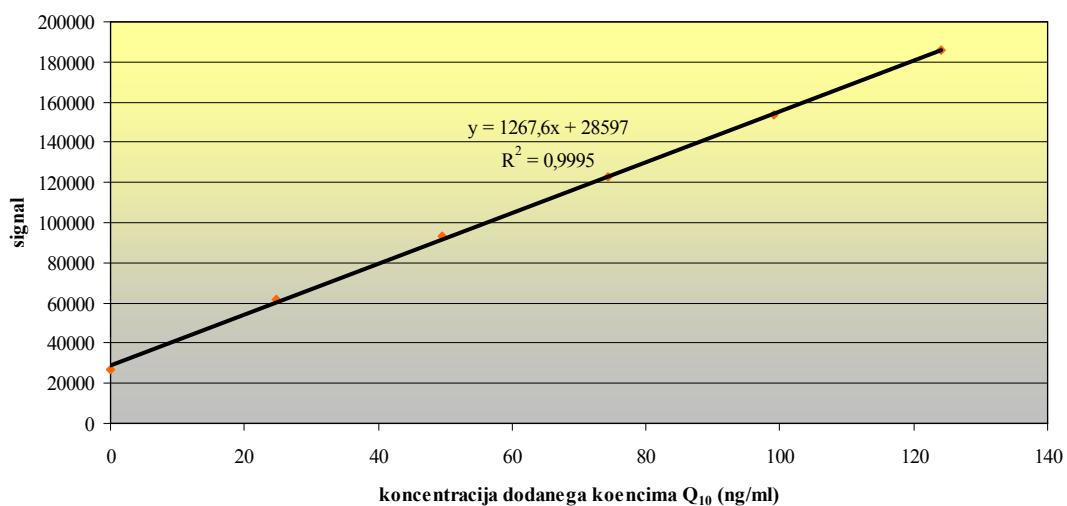
Slika 27: Umeritvena krivulja 2 – linearnost vpliva matriksa kože na signal koencima Q<sub>10</sub>.



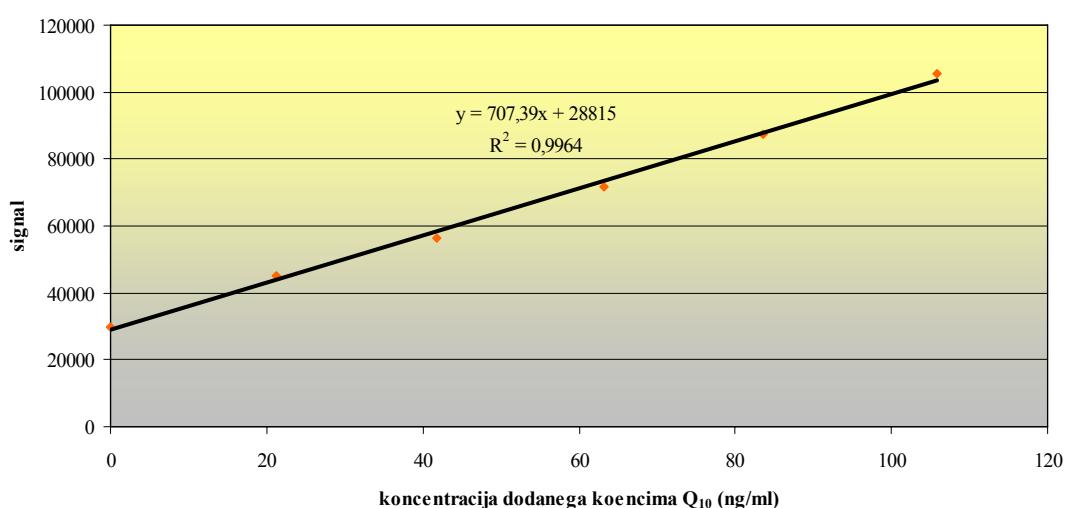
Slika 28: Umeritvena krivulja 3 – linearnost vpliva postopka in matriksa kože na signal koencima Q<sub>10</sub>.

#### 4.2.3.2 Umeritvene krivulje za maščobo

Linearnost vpliva matriksa maščobe ter postopka in matriksa na signal koencima Q<sub>10</sub> smo preverili z enakim postopkom kot pri maščobi. Na osnovi dobljenih Pearsonovih korelacijskih koeficientov ( $R^2$ ) (sliki 29 in 30) smo potrdili linearost signala koencima Q<sub>10</sub> v preiskovanem območju.



**Slika 29:** Umeritvena krivulja 2 – linearnost vpliva matriksa maščobe na signal koencima Q<sub>10</sub>.



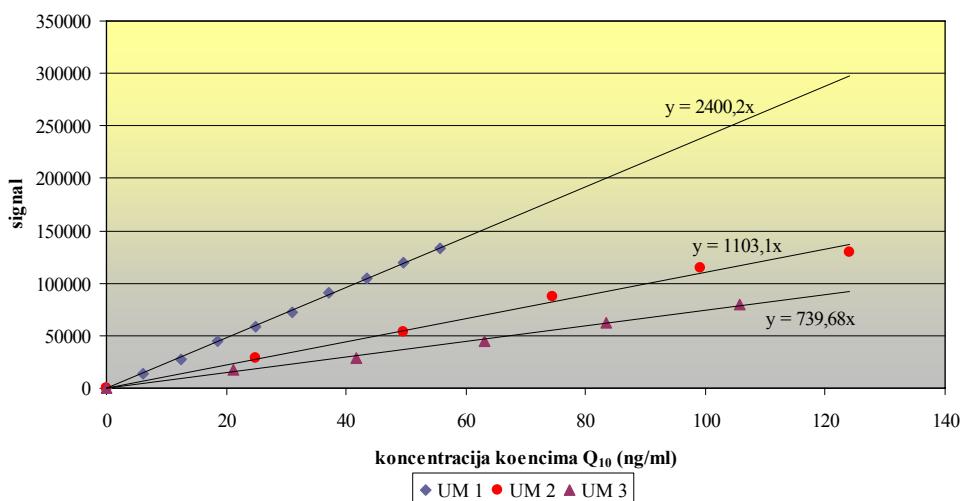
**Slika 30:** Umeritvena krivulja 3 – linearnost vpliva postopka in matriksa maščobe na signal koencima Q<sub>10</sub>.

#### 4.2.4 Izkoristki metode

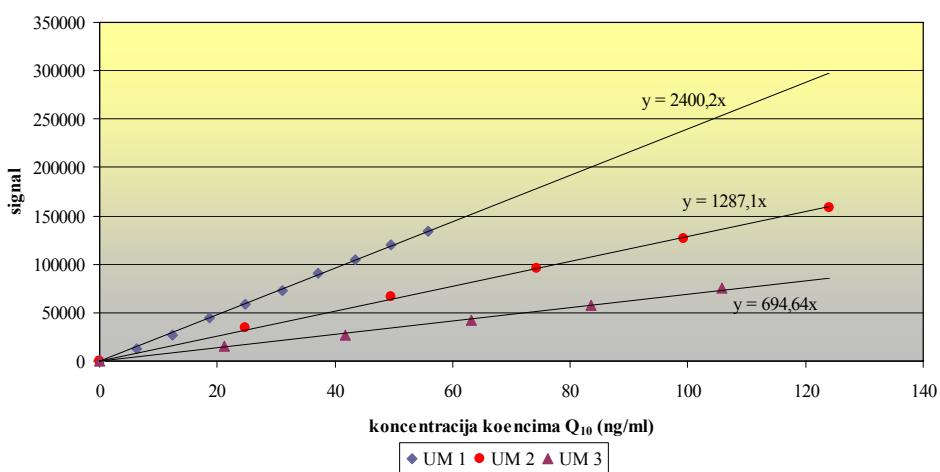
Za izračun izkoristkov naše metode smo upoštevali faktorje naklonov krivulj (slike 31 in 32). Določili smo tri vrste izkoristkov:

- izkoristek metode z vplivom matriksa in postopka (koža – 30,8 %; maščoba – 28,9 %);
- izkoristek metode z vplivom postopka (koža – 67,1 %; maščoba – 54,0 %);
- izkoristek metode z vplivom matriksa (koža – 46,0 %; maščoba – 53,6 %).

Kot smo pričakovali, ima velik vpliv na izkoristek naše metode matriks vzorca (koža oz. maščoba) predvsem zaradi velike vsebnosti maščobnega tkiva.



Slika 31: Umeritvene krivulje za kožo: UM1-umeritvena 1, UM2-umeritvena 2 in UM3-umeritvena 3 (poglavlje 3.2.1.2).



Slika 32: Umeritvene krivulje za maščobo: UM1-umeritvena 1, UM2-umeritvena 2 in UM3-umeritvena 3 (poglavlje 3.2.1.2).

#### 4.2.5 Meje detekcije in kvantifikacije

**Preglednica 7: Meje detekcije pri določevanju vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> (pg nanosa na kolono pri injiciraju 15 µl).**

	meja detekcije	meja kvantifikacije
LC-MS	30	90
koža	102	273
maščoba	111	298

Pogoji detekcije so opisani v poglavju 3.2.1.1.

Določene meje detekcije samega sistema LC-MS so majhne, kar nam omogoča detekcijo zelo majhnih vsebnosti koencima Q<sub>10</sub>. Približno 3-krat večje so detekcije v primeru kože in maščobe, kar soupada z izkoristki same metode (koža – 30,8 %; maščoba – 28,9 %).

### 4.3 APLIKACIJA ANALITSKE METODE

#### 4.3.1 Povprečne vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v koži in maščobi

Povprečne vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v koži in maščobi so prikazane v preglednici 8. Za kožo je značilna nekoliko večja vsebnost koencima Q<sub>10</sub> v primerjavi z maščobo. Tako smo v koži v povprečju določili 5,52 µg/g, v maščobi pa 2,12 µg/g koencima Q<sub>10</sub>. Vrednosti koencima Q<sub>10</sub> v koži močno variirajo in se gibljejo med 1,74 µg/g in 14,50 µg/g. V maščobi dosega koencim Q<sub>10</sub> minimum pri 0,68 µg/g, maksimum pa pri 4,85 µg/g. Za kožo je značilen velik koeficient variabilnosti (65,44 %), kar kaže na veliko heterogenost med posameznimi določitvami v tem tkivu. Prav tako je precej velika heterogenost značilna tudi za maščobo (KV je 47,09 %).

**Preglednica 8: Rezultati določanja vsebnosti Q<sub>10</sub> (µg/g) v piščančji koži in maščobi z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.**

Tkivo	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
maščoba	30	2,12	0,68	4,85	1,00	47,09
koža	30	5,52	1,74	14,50	3,61	65,44

n – število opazovanj,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti.

#### 4.3.2 Povprečne vsebnosti maščobnih kislin in holesterola v maščobi

Povprečna vrednost nasičenih maščobnih kislin (NMK) v maščobi znaša 27,08 ut. %. Največji delež prehransko zanimivih NMK pripada palmitinski kislini (C16:0) (20,57 ut. %), sledi ji stearinska kislina (C18:0) z bistveno nižjo vsebnostjo (5,61 ut. %). Najmanjši delež NMK pa pripada miristinski kislini (C14:0) (0,43 ut. %) (preglednica 9). Povprečna vsebnost enkrat nenasičenih maščobnih kislin (ENMK), ki predstavlja največji ut. % od skupnih MK, znaša 38,28 ut. %. Z nekoliko manjšim ut. % (34,64) jim sledijo večkrat nenasičene maščobne kisline (VNMK). Med ENMK sta najpomembnejši oleinska (C18:1c-9) in eikozaenojska kislina (C20:1c-8). Povprečna vsebnost oleinske kisline (C18:1c-9) je 29,80 ut. % ter predstavlja kar 78 % vseh ENMK, eikozaenojske kisline (C20:1c-8) pa je v povprečju le 0,35 ut. %. Linolna kislina (C18:2c-9,12) z 31,11 ut. % predstavlja največji delež VNMK. Sledijo ji še  $\alpha$ -linolenska kislina (C18:3c-9,12,15) z 2,40 ut. % ter eikozapentaenojska (C20:5c-5,8,11,14,17) (EPK), dokozapentaenojska (C22:5c-7,10,13,16,19) (DPK) in dokozaheksaenojska kislina (C22:6c-4,7,10,13,16,19) (DHK), z vsebnostjo pod 1 ut. %.  $n$ -6 maščobnih kislin je v povprečju 31,17 ut. % (90 % vseh VNMK),  $n$ -3 maščobnih kislin pa le 2,63 ut. %. Razmerje med  $n$ -6 in  $n$ -3 maščobnimi kislinami znaša 12,28. V maščobi dosega razmerje med VNMK in NMK (P/S) vrednost 1,28, indeks aterogenosti (IA) pa 0,31. Nizek IA je predvsem posledica nizke vsebnosti miristinske kisline (C14:0), ki ima pri izračunu IA največji vpliv.

V povprečju je v 100 g maščobe 128,3 mg holesterola. Minimalna vrednost holesterola v maščobi znaša 105,3 mg/100 g, maksimalna pa 161,10 mg/100 g.

**Preglednica 9: Rezultati določanja maščobnokislinske sestave (ut. % od skupnih MK) in holesterola (mg/100g) v piščančji maščobi z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.**

Parameter	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
C10:0	30	0,00	0,00	0,01	0,00	221,88
C12:0	30	0,02	0,01	0,02	0,00	14,34
C14:0	30	0,43	0,34	0,55	0,05	11,93
C14:1t-9	30	0,01	0,01	0,02	0,00	14,01
C14:1c-9	30	0,10	0,07	0,12	0,02	18,42
C15:0	30	0,08	0,07	0,10	0,01	10,94
C15:1c-5	30	0,03	0,01	0,04	0,01	26,87
C16:0	30	20,57	19,36	22,46	0,91	4,43
C16:1t-9	30	0,27	0,20	0,33	0,04	15,36
C16:1c-9	30	3,77	2,75	4,61	0,57	15,00
C17:0	30	0,14	0,11	0,17	0,02	11,00
C17:1t-10	30	0,24	0,15	0,30	0,04	15,23
C17:1c-10	30	0,07	0,06	0,08	0,00	6,73
C18:0	30	0,04	0,02	0,06	0,01	31,47
C18:0	30	5,61	4,55	6,77	0,56	9,96
C18:1t-9	30	0,06	0,04	0,07	0,01	13,03
C18:1c-9	30	29,80	27,64	31,48	1,10	3,68
C18:1c-11	30	3,82	2,93	4,51	0,53	13,78
C18:2c-9,12	30	31,11	28,74	33,83	1,36	4,38
C20:0	30	0,13	0,06	0,21	0,05	34,98
C18:3c-9,12,15	30	2,40	1,45	3,04	0,46	19,26
C20:1c-8	30	0,35	0,28	0,50	0,04	12,35
C21:0	30	0,02	0,00	0,06	0,02	87,76
C20:2c-11,14	30	0,03	0,01	0,21	0,06	170,69
C20:3c-8,11,14	30	0,02	0,00	0,03	0,01	40,84
C20:3c-11,14,17	30	0,13	0,10	0,15	0,02	13,82
C22:0	30	0,04	0,00	0,05	0,01	31,60
C22:1c-13	30	0,27	0,02	0,49	0,15	58,08
C23:0	30	0,01	0,00	0,02	0,01	87,63
C20:5c-5,8,11,14,17	30	0,04	0,01	0,08	0,02	45,98
C22:2c-13,16	30	0,02	0,00	0,05	0,02	94,20
C24:0	30	0,04	0,01	0,10	0,03	66,42

### Nadaljevanje preglednice 9.

Parameter	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
C24:1c-9	30	0,07	0,05	0,10	0,02	22,87
C22:5c-7,10,13,16,19	30	0,04	0,03	0,06	0,01	21,60
C22:6c-4,7,10,13,16,19	30	0,02	0,00	0,04	0,01	48,80
NMK	30	27,08	25,18	29,75	1,18	4,35
ENMK	30	38,28	35,87	39,99	1,22	3,18
VNMK	30	34,64	32,33	37,39	1,39	4,01
P/S	30	1,28	1,11	1,41	0,09	7,27
n-6	30	31,17	28,76	34,08	1,39	4,46
n-3	30	2,63	1,70	3,29	0,47	17,85
n-6/n-3	30	12,28	9,50	18,10	2,56	20,85
IA	30	0,31	0,28	0,35	0,02	6,35
holesterol	30	128,33	105,53	161,10	17,37	13,54

n – število opazovanj,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti; nasičene maščobne kisline – NMK: C10:0, C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, iC18:0, C18:0, C20:0, C21:0, C22:0, C23:0, C24:0; enkrat nenasicičene maščobne kisline – ENMK: C14:1t-9, C14:1c-9, C15:1c-5, C16:1t-9, C16:1c-9, C17:1t-10, C17:1c-10, C18:1t-9, C18:1c-9, C18:1c-11, C20:1c-8, C22:1c-13, C24:1c-9; večkrat nenasicičene maščobne kisline – VNMK: C18:2c-9,12, C18:3c-9,12,15, C20:2c-11,14, C20:3c-8,11,14, C20:3c-11,14,17, C22:2c-13,16, C20:5n-6,9,11,14,17, C22:5c-7,10,13,16,19, C22:6n-4,7,10,13,16,19; P/S – VNMK/NMK; n-6: C18:2c-9,12, C20:2c-11,14, C20:3c-8,11,14, C22:2c-13,16; n-3: C18:3c-9,12,15, C20:3c-11,14,17, C20:5c-5,8,11,14,17, C22:5c-7,10,13,16,19, C22:6c-4,7,10,13,16,19; indeks aterogenosti – IA = (C12:0 + 4 × C14:0 + C16:0)/(n-6 + n-3 + C18:1c-9 + druge ENMK) (Ulbricht in Southgate, 1991).

#### 4.3.3 Povprečne vsebnosti maščobnih kislin in holesterola v koži

Povprečne vsebnosti maščobnih kislin in holesterola v koži so prikazane v preglednici 10. V koži smo določili podobne rezultate kot v maščobi. Prav tako največji delež skupnih MK pripada ENMK (37,87 ut. %), sledijo VNMK (35,00 ut. %), najmanjša vrednost pa je značilna za NMK (27,13 ut. %). Glavna NMK je tako kot v maščobi palmitinska kislina (C16:0) (20,45 ut. %), z bistveno manjšimi deleži pa ji sledita stearinska (C18:0) (5,65 ut. %) in miristinska kislina (C14:0) (0,44 ut. %). Med ENMK, enako kot v maščobi, izstopa oleinska kislina (C18:1c-9) z 29,03 ut. % in predstavlja kar 77 % vseh ENMK. Delež eikozaenojske kisline (C20:1c-8) je znatno manjši (0,34 ut. %). Med VNMK izstopata linolna (C18:2c-9,12) z 31,76 ut. % in  $\alpha$ -linolenska kislina (C18:3c-9,12,15) z 2,19 ut. %, pomembne so tudi EPK (C20:5c-5,8,11,14,17), DPK (C22:5c-7,10,13,16,19) in DHK (C22:6c-4,7,10,13,16,19), katere spadajo med n-3 MK (2,5 ut. %). n-6 MK z 31,81 ut. % predstavljajo, podobno kot v maščobi, kar 91 % vseh VNMK. Razmerje n-6/n-3 je primerljivo z razmerjem v maščobi (v koži 12,77; v maščobi 12,28). Prav tako je primerljivo razmerje P/S (koža 1,29; maščoba 1,28). Indeks aterogenosti (IA) pa v koži dosega enako vrednost kot v maščobi (0,31).

Povprečna vrednost holesterola v koži znaša 138,52 mg/100 g, minimalna vrednost 100,93 mg/100 g, maksimalna pa 173,03 mg/100 g. Koeficient variabilnosti je nekoliko večji v primerjavi z maščobo.

**Preglednica 10: Rezultati določanja maščobnokislinske sestave (ut. % od skupnih MK) in holesterola (mg/100 g) v piščančji koži z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.**

Parameter	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
C10:0	30	0,02	0,01	0,04	0,01	41,39
C12:0	30	0,02	0,01	0,03	0,00	13,22
C14:0	30	0,44	0,37	0,54	0,04	9,10
C14:1t-9	30	0,01	0,01	0,02	0,00	20,45
C14:1c-9	30	0,10	0,01	0,13	0,03	24,71
C15:0	30	0,08	0,07	0,09	0,01	8,44
C15:1c-5	30	0,02	0,02	0,03	0,00	15,92
C16:0	30	20,45	19,18	22,63	0,91	4,45
C16:1t-9	30	0,26	0,21	0,34	0,03	12,43
C16:1c-9	30	3,75	0,73	4,81	0,79	20,96
C17:0	30	0,16	0,13	0,22	0,02	13,66
C17:1t-10	30	0,24	0,19	0,29	0,02	10,41
C17:1c-10	30	0,10	0,07	0,79	0,13	134,54
iC18:0	30	0,03	0,00	0,05	0,01	34,66
C18:0	30	5,65	4,99	6,84	0,55	9,82
C18:1t-9	30	0,06	0,05	0,07	0,01	8,32
C18:1c-9	30	29,03	26,59	32,00	1,34	4,61
C18:1c-11	30	3,89	3,11	5,46	0,46	11,72
C18:2c-9,12	30	31,76	28,92	35,22	1,78	5,59
C20:0	30	0,17	0,09	0,21	0,03	19,85
C18:3c-9,12,15	30	2,19	1,58	2,54	0,19	8,88
C20:1c-8	30	0,34	0,29	0,38	0,03	8,03
C21:0	30	0,03	0,00	0,06	0,01	40,89
C20:2c-11,14	30	0,02	0,01	0,02	0,00	21,25
C20:3c-8,11,14	30	0,02	0,01	0,03	0,01	25,39
C20:3c-11,14,17	30	0,15	0,02	0,19	0,03	20,41
C22:0	30	0,05	0,04	0,07	0,01	17,59
C22:1c-13	30	0,52	0,36	0,67	0,09	17,08
C23:0	30	0,01	0,00	0,02	0,01	44,13
C20:5c-5,8,11,14,17	30	0,04	0,02	0,07	0,02	36,15
C22:2c-13,16	30	0,02	0,01	0,06	0,01	83,46

**Nadaljevanje preglednice 10.**

Parameter	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
C24:0	30	0,04	0,01	0,09	0,02	38,76
C24:1c-9	30	0,11	0,09	0,16	0,02	17,13
C22:5c-7,10,13,16,19	30	0,08	0,06	0,10	0,01	15,85
C22:6c-4,7,10,13,16,19	30	0,03	0,02	0,07	0,01	35,88
NMK	30	27,13	25,34	29,25	1,18	4,37
ENMK	30	37,87	34,88	40,30	1,75	4,63
VNMK	30	35,00	31,76	39,56	1,98	5,66
P/S	30	1,29	1,12	1,55	0,11	8,62
n-6	30	31,81	28,96	35,31	1,78	5,59
n-3	30	2,50	1,94	2,86	0,19	7,65
n-6/n-3	30	12,77	11,00	15,22	0,97	7,63
IA	30	0,31	0,28	0,35	0,02	6,12
holesterol	30	138,52	100,93	173,03	23,26	16,79

Legenda: glej preglednico 9.

**4.3.4 Vpliv dodanega Q<sub>10</sub> na njegovo vsebnost v piščančji koži in maščobi**

Dodatek različnih količin koencima Q<sub>10</sub> v krmo piščancev ima statistično zelo visoko značilen vpliv na njegovo vsebnost v koži in maščobi. Prav tako statistično zelo visoko značilen vpliv kaže tudi vrsta tkiva ter interakcija vrste tkiva in dodatka (preglednica 11).

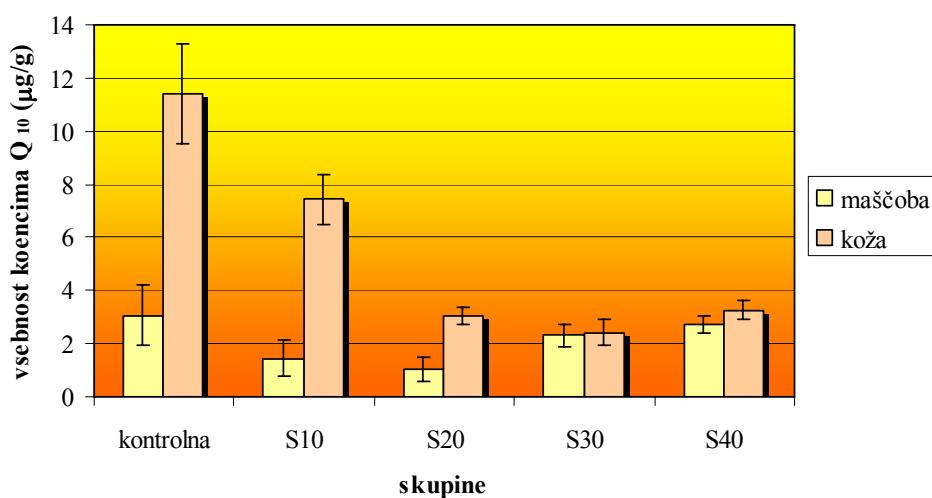
Koža ima v kontrolni skupini največjo vsebnost koencima Q<sub>10</sub> (11,42 µg/g) in se statistično značilno razlikuje glede na ostale skupine. 10- in 20- dnevno dodajanje koencima Q<sub>10</sub> v krmo (skupini S10 in S20) privede do bistvenega zmanjšanja njegove vsebnosti. Vsebnost koencima Q<sub>10</sub> se spet nekoliko poveča v skupini S40 (40-dnevno dodajanje koencima Q<sub>10</sub> v krmo), ki pa se statistično značilno ne razlikuje od vsebnosti v skupinah S20 in S30.

**Preglednica 11: Vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo piščancev na njegovo vsebnost (µg/g) v piščančji koži in maščobi (Duncanov test,  $\alpha = 0,05$ ).**

Tkivo	dodatek Q <sub>10</sub> ( $\bar{x} \pm so$ )					D	T	D*T
	kontrolna	S10	S20	S30	S40			
koža (n=6)	11,42±1,88 <sup>ax</sup>	7,43±0,95 <sup>bx</sup>	3,06±0,34 <sup>cx</sup>	2,43±0,46 <sup>cx</sup>	3,27±0,38 <sup>cx</sup>	***	***	***
maščoba (n=6)	3,07±1,14 <sup>ay</sup>	1,43±0,68 <sup>by</sup>	1,05±0,46 <sup>by</sup>	2,31±0,41 <sup>ax</sup>	2,75±0,32 <sup>ax</sup>			

S10, S20, S30, S40 – 10, 20, 30 in 40 dnevno krmljenje piščancev s koencimom Q<sub>10</sub>; n – število obravnavanj v skupini,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, so – standardni odklon; D – vpliv dodatka koencima Q<sub>10</sub> v krmo; T – vpliv analiziranega tkiva (maščobe in kože); D\*T – interakcija vrste tkiva in dodatka koencima Q<sub>10</sub>; \*\*\*  $p \leq 0,001$  statistično zelo visoko značilen vpliv, \*\*  $p \leq 0,01$  statistično visoko značilen vpliv, \*  $p \leq 0,05$  statistično značilen vpliv, nz –  $p > 0,05$  statistično neznačilen vpliv, <sup>x,y</sup> vrednosti z enako nadpisano črko znotraj stolpcu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo, <sup>a,b,c</sup> vrednosti z enako nadpisano črko znotraj vrstice se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

V maščobi ima koencim Q<sub>10</sub> prav tako največjo vsebnost v kontrolni skupini (3,07 µg/g), ki se statistično značilno ne razlikuje od vsebnosti v skupinah S30 in S40. Podobno kot v koži, tudi tukaj opazimo značilno zmanjšanje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v skupinah S10 in S20. Vpliv tkiva na vsebnost koencima Q<sub>10</sub> je najbolj izrazit v kontrolni skupini ter v skupinah S10 in S20. Koža in maščoba se namreč v teh skupinah med seboj statistično značilno razlikujeta v vsebnosti koencima Q<sub>10</sub>, medtem ko v skupinah S30 in S40 ni opaznih statističnih razlik. Spreminjanje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v koži in maščobi v posameznih skupinah je lepo prikazano na sliki 33.



**Slika 33:** Vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo na njegovo vsebnost v piščančji koži in maščobi.

#### 4.3.5 Vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo na maščobnokislinsko sestavo piščančje kože in maščobe

**Preglednica 12: Vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo piščancev in vrste tkiva na vsebnost holesterola (mg/100 g) in maščobnokislinsko sestavo (ut. % od skupnih MK) v piščančji maščobi in koži (n = 6, Duncanov test,  $\alpha = 0,05$ ).**

Parameter	tkivo	dodatek Q <sub>10</sub> ( $\bar{x} \pm so$ )					T	D	T*D
		kontrolna	S10	S20	S30	S40			
C10:0	maščoba	0,00±0,00 <sup>by</sup>	0,00±0,00 <sup>by</sup>	0,00±0,00 <sup>ay</sup>	0,00±0,00 <sup>by</sup>	0,00±0,00 <sup>aby</sup>	***	nz	nz
	koža	0,02±0,01 <sup>ax</sup>	0,02±0,01 <sup>ax</sup>	0,02±0,00 <sup>ax</sup>	0,03±0,01 <sup>ax</sup>	0,01±0,01 <sup>ax</sup>			
C12:0	maščoba	0,02±0,00 <sup>ay</sup>	0,02±0,00 <sup>by</sup>	0,02±0,00 <sup>ax</sup>	0,02±0,00 <sup>abx</sup>	0,02±0,00 <sup>abx</sup>	***	**	nz
	koža	0,02±0,00 <sup>ax</sup>	0,02±0,00 <sup>bx</sup>	0,02±0,00 <sup>abx</sup>	0,02±0,00 <sup>bx</sup>	0,02±0,00 <sup>bx</sup>			
C14:0	maščoba	0,49±0,04 <sup>ax</sup>	0,40±0,02 <sup>bx</sup>	0,43±0,02 <sup>bx</sup>	0,41±0,03 <sup>bx</sup>	0,41±0,08 <sup>bx</sup>	nz	***	nz
	koža	0,49±0,04 <sup>ax</sup>	0,41±0,02 <sup>bx</sup>	0,43±0,03 <sup>bx</sup>	0,42±0,02 <sup>bx</sup>	0,43±0,04 <sup>bx</sup>			
C14:1t-9	maščoba	0,02±0,00 <sup>ax</sup>	0,01±0,00 <sup>bx</sup>	0,01±0,00 <sup>abx</sup>	0,01±0,00 <sup>abx</sup>	0,02±0,00 <sup>abx</sup>	nz	**	nz
	koža	0,02±0,00 <sup>abx</sup>	0,01±0,00 <sup>bcx</sup>	0,01±0,00 <sup>abcx</sup>	0,01±0,00 <sup>ex</sup>	0,02±0,00 <sup>ax</sup>			
C14:1c-9	maščoba	0,12±0,01 <sup>ax</sup>	0,09±0,02 <sup>bx</sup>	0,10±0,02 <sup>abx</sup>	0,09±0,01 <sup>bx</sup>	0,10±0,02 <sup>abx</sup>	nz	***	nz
	koža	0,12±0,01 <sup>ax</sup>	0,08±0,04 <sup>cx</sup>	0,11±0,02 <sup>abx</sup>	0,09±0,01 <sup>bcx</sup>	0,11±0,01 <sup>abx</sup>			
C15:0	maščoba	0,08±0,01 <sup>ax</sup>	0,08±0,01 <sup>abx</sup>	0,07±0,01 <sup>bx</sup>	0,08±0,01 <sup>ax</sup>	0,08±0,00 <sup>abx</sup>	nz	***	nz
	koža	0,08±0,00 <sup>bx</sup>	0,08±0,01 <sup>bx</sup>	0,08±0,00 <sup>cx</sup>	0,09±0,00 <sup>ax</sup>	0,08±0,00 <sup>bcx</sup>			
C15:1c-5	maščoba	0,02±0,00 <sup>ay</sup>	0,03±0,00 <sup>ax</sup>	0,03±0,01 <sup>ax</sup>	0,03±0,01 <sup>ax</sup>	0,02±0,01 <sup>ax</sup>	nz	nz	nz
	koža	0,03±0,00 <sup>ax</sup>	0,03±0,01 <sup>ax</sup>	0,02±0,00 <sup>ay</sup>	0,02±0,00 <sup>ax</sup>	0,02±0,00 <sup>ax</sup>			
C16:0	maščoba	21,59±0,69 <sup>ax</sup>	20,25±0,83 <sup>bx</sup>	21,05±0,58 <sup>ax</sup>	19,86±0,36 <sup>bx</sup>	19,87±0,59 <sup>bx</sup>	nz	***	nz
	koža	20,82±0,78 <sup>ax</sup>	20,31±0,93 <sup>abx</sup>	20,87±1,05 <sup>ax</sup>	19,67±0,25 <sup>bx</sup>	20,57±1,01 <sup>abx</sup>			
C16:1t-9	maščoba	0,26±0,04 <sup>ax</sup>	0,29±0,05 <sup>ax</sup>	0,25±0,02 <sup>ax</sup>	0,25±0,05 <sup>ax</sup>	0,29±0,01 <sup>ax</sup>	nz	*	nz
	koža	0,26±0,03 <sup>abx</sup>	0,27±0,05 <sup>abx</sup>	0,26±0,01 <sup>abx</sup>	0,24±0,02 <sup>bx</sup>	0,29±0,03 <sup>ax</sup>			
C16:1c-9	maščoba	4,16±0,33 <sup>ax</sup>	3,48±0,61 <sup>bx</sup>	3,99±0,76 <sup>abx</sup>	3,35±0,25 <sup>bx</sup>	3,91±0,23 <sup>abx</sup>	nz	*	nz
	koža	4,21±0,33 <sup>ax</sup>	3,70±0,55 <sup>ax</sup>	3,42±1,50 <sup>ax</sup>	3,34±0,37 <sup>ax</sup>	4,10±0,22 <sup>ax</sup>			
C17:0	maščoba	0,14±0,01 <sup>aby</sup>	0,14±0,02 <sup>abx</sup>	0,12±0,02 <sup>by</sup>	0,15±0,00 <sup>ay</sup>	0,14±0,00 <sup>aby</sup>	***	***	nz
	koža	0,16±0,01 <sup>bx</sup>	0,17±0,04 <sup>abx</sup>	0,15±0,02 <sup>bx</sup>	0,19±0,01 <sup>ax</sup>	0,15±0,01 <sup>bx</sup>			
C17:1t-10	maščoba	0,25±0,02 <sup>ax</sup>	0,24±0,04 <sup>abx</sup>	0,20±0,03 <sup>bx</sup>	0,25±0,04 <sup>ax</sup>	0,24±0,03 <sup>abx</sup>	nz	*	nz
	koža	0,24±0,01 <sup>ax</sup>	0,23±0,03 <sup>ax</sup>	0,23±0,02 <sup>ax</sup>	0,26±0,03 <sup>ax</sup>	0,24±0,02 <sup>ax</sup>			
C17:1c-10	maščoba	0,07±0,00 <sup>ax</sup>	0,07±0,00 <sup>ax</sup>	0,07±0,01 <sup>ax</sup>	0,07±0,01 <sup>ax</sup>	0,07±0,00 <sup>ax</sup>	nz	nz	nz
	koža	0,07±0,01 <sup>ax</sup>	0,07±0,00 <sup>ax</sup>	0,19±0,29 <sup>ax</sup>	0,08±0,00 <sup>ax</sup>	0,07±0,00 <sup>ax</sup>			
C18:0	maščoba	0,03±0,00 <sup>bx</sup>	0,04±0,01 <sup>abx</sup>	0,05±0,02 <sup>ax</sup>	0,05±0,01 <sup>ax</sup>	0,05±0,01 <sup>ax</sup>	***	**	nz
	koža	0,02±0,00 <sup>bx</sup>	0,03±0,00 <sup>aby</sup>	0,02±0,02 <sup>by</sup>	0,03±0,00 <sup>abx</sup>	0,04±0,01 <sup>ax</sup>			
C18:0	maščoba	5,75±0,46 <sup>ax</sup>	5,74±0,41 <sup>ax</sup>	5,68±0,86 <sup>ax</sup>	5,53±0,57 <sup>ax</sup>	5,23±0,35 <sup>ax</sup>	nz	nz	nz
	koža	5,54±0,43 <sup>ax</sup>	5,86±0,74 <sup>ax</sup>	5,70±0,71 <sup>ax</sup>	5,71±0,54 <sup>ax</sup>	5,44±0,35 <sup>ax</sup>			

**Nadaljevanje preglednice 12.**

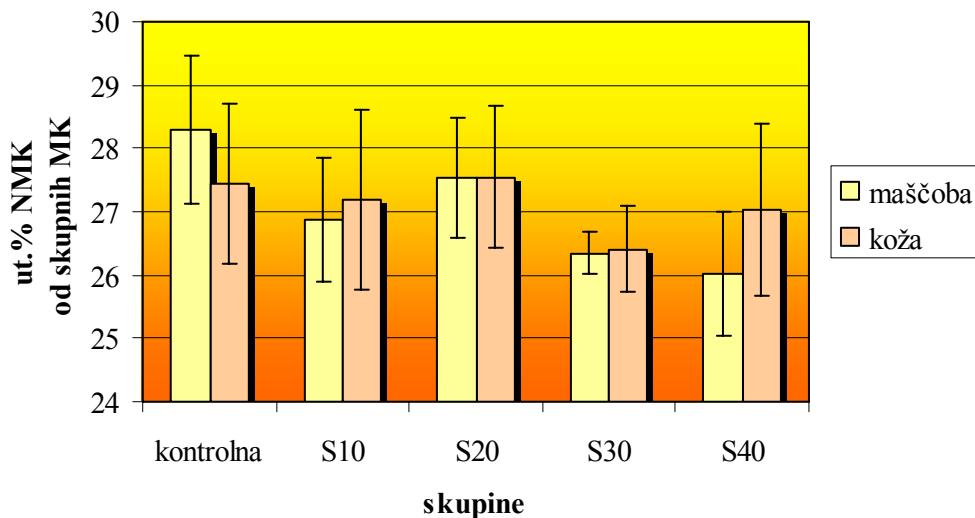
Parameter	tkivo	dodatek Q <sub>10</sub> ( $\bar{x} \pm so$ )					T	D	T*D
		kontrolna	S10	S20	S30	S40			
C18:1t-9	maščoba	0,06±0,00 <sup>ax</sup>	0,05±0,01 <sup>by</sup>	0,06±0,00 <sup>ax</sup>	0,06±0,01 <sup>ax</sup>	0,06±0,01 <sup>abx</sup>	nz	*	nz
	koža	0,06±0,00 <sup>abx</sup>	0,06±0,00 <sup>abx</sup>	0,06±0,00 <sup>ax</sup>	0,06±0,01 <sup>bx</sup>	0,06±0,00 <sup>abx</sup>			
C18:1c-9	maščoba	29,09±0,48 <sup>bx</sup>	30,23±1,19 <sup>ax</sup>	30,84±0,44 <sup>ax</sup>	28,75±0,98 <sup>bx</sup>	30,24±0,36 <sup>ax</sup>	**	***	nz
	koža	28,26±0,52 <sup>by</sup>	29,56±1,72 <sup>ax</sup>	29,98±1,14 <sup>ax</sup>	27,69±1,00 <sup>bx</sup>	29,69±0,24 <sup>ay</sup>			
C18:1c-11	maščoba	3,85±0,39 <sup>cx</sup>	3,96±0,08 <sup>bex</sup>	2,99±0,05 <sup>dy</sup>	4,18±0,24 <sup>abx</sup>	4,30±0,35 <sup>ax</sup>	nz	***	***
	koža	4,06±0,68 <sup>ax</sup>	3,81±0,34 <sup>abx</sup>	3,98±0,12 <sup>ax</sup>	3,40±0,25 <sup>by</sup>	4,20±0,29 <sup>ax</sup>			
C18:2c-9,12	maščoba	31,06±0,71 <sup>bx</sup>	30,59±1,52 <sup>bx</sup>	30,53±1,41 <sup>bx</sup>	32,58±1,18 <sup>ay</sup>	30,60±0,66 <sup>bx</sup>	*	***	nz
	koža	31,74±0,99 <sup>bx</sup>	31,32±1,69 <sup>bx</sup>	30,69±1,13 <sup>bx</sup>	34,47±0,46 <sup>ax</sup>	30,57±0,92 <sup>bx</sup>			
C20:0	maščoba	0,14±0,02 <sup>aby</sup>	0,13±0,04 <sup>abx</sup>	0,09±0,04 <sup>by</sup>	0,15±0,05 <sup>ax</sup>	0,15±0,06 <sup>aby</sup>	***	nz	nz
	koža	0,17±0,01 <sup>abx</sup>	0,18±0,04 <sup>abx</sup>	0,16±0,00 <sup>abx</sup>	0,15±0,05 <sup>bx</sup>	0,20±0,00 <sup>ax</sup>			
C18:3c-9,12,15	maščoba	2,01±0,45 <sup>cx</sup>	2,14±0,67 <sup>bex</sup>	2,58±0,12 <sup>abx</sup>	2,65±0,02 <sup>abx</sup>	2,73±0,22 <sup>ax</sup>	**	*	*
	koža	2,26±0,13 <sup>ax</sup>	2,15±0,35 <sup>ax</sup>	2,13±0,19 <sup>ay</sup>	2,18±0,07 <sup>ay</sup>	2,24±0,17 <sup>ay</sup>			
C20:1c-8	maščoba	0,31±0,04 <sup>bx</sup>	0,38±0,01 <sup>ax</sup>	0,35±0,02 <sup>abx</sup>	0,37±0,06 <sup>ax</sup>	0,35±0,04 <sup>abx</sup>	*	***	nz
	koža	0,31±0,03 <sup>cx</sup>	0,36±0,01 <sup>ax</sup>	0,35±0,01 <sup>abx</sup>	0,31±0,01 <sup>cx</sup>	0,34±0,02 <sup>bx</sup>			
C21:0	maščoba	0,00±0,01 <sup>by</sup>	0,01±0,01 <sup>by</sup>	0,02±0,02 <sup>bx</sup>	0,04±0,01 <sup>ax</sup>	0,04±0,02 <sup>ax</sup>	*	**	*
	koža	0,03±0,01 <sup>ax</sup>	0,04±0,02 <sup>ax</sup>	0,03±0,02 <sup>ax</sup>	0,03±0,01 <sup>ax</sup>	0,04±0,01 <sup>ax</sup>			
C20:2c-11,14	maščoba	0,04±0,08 <sup>ax</sup>	0,02±0,00 <sup>ay</sup>	0,01±0,00 <sup>ax</sup>	0,07±0,09 <sup>ax</sup>	0,02±0,00 <sup>ax</sup>	nz	nz	nz
	koža	0,01±0,00 <sup>cx</sup>	0,02±0,00 <sup>ax</sup>	0,02±0,00 <sup>bex</sup>	0,01±0,00 <sup>bex</sup>	0,02±0,00 <sup>abx</sup>			
C20:3c-8,11,14	maščoba	0,01±0,01 <sup>ax</sup>	0,02±0,01 <sup>ax</sup>	0,01±0,00 <sup>ay</sup>	0,02±0,01 <sup>ax</sup>	0,02±0,01 <sup>ax</sup>	*	**	nz
	koža	0,01±0,00 <sup>bx</sup>	0,02±0,00 <sup>ax</sup>	0,02±0,00 <sup>ax</sup>	0,02±0,01 <sup>ax</sup>	0,02±0,00 <sup>ax</sup>			
C20:3c-11,14,17	maščoba	0,11±0,01 <sup>by</sup>	0,14±0,01 <sup>ay</sup>	0,14±0,02 <sup>ax</sup>	0,14±0,01 <sup>ax</sup>	0,14±0,02 <sup>ax</sup>	**	***	nz
	koža	0,13±0,01 <sup>bx</sup>	0,18±0,01 <sup>ax</sup>	0,15±0,02 <sup>abx</sup>	0,14±0,06 <sup>bx</sup>	0,16±0,01 <sup>abx</sup>			
C22:0	maščoba	0,03±0,00 <sup>aby</sup>	0,04±0,00 <sup>ay</sup>	0,03±0,02 <sup>bx</sup>	0,04±0,01 <sup>ay</sup>	0,04±0,01 <sup>ax</sup>	***	***	nz
	koža	0,04±0,00 <sup>bx</sup>	0,05±0,01 <sup>ax</sup>	0,04±0,00 <sup>bx</sup>	0,05±0,01 <sup>ax</sup>	0,04±0,00 <sup>bx</sup>			
C22:1c-13	maščoba	0,18±0,08 <sup>by</sup>	0,26±0,18 <sup>aby</sup>	0,19±0,13 <sup>by</sup>	0,35±0,19 <sup>aby</sup>	0,39±0,06 <sup>ay</sup>	***	**	nz
	koža	0,41±0,03 <sup>bx</sup>	0,57±0,05 <sup>ax</sup>	0,51±0,07 <sup>ax</sup>	0,59±0,10 <sup>ax</sup>	0,51±0,05 <sup>ax</sup>			
C23:0	maščoba	0,00±0,00 <sup>bx</sup>	0,01±0,01 <sup>abx</sup>	0,01±0,00 <sup>ax</sup>	0,01±0,01 <sup>abx</sup>	0,01±0,01 <sup>aby</sup>	**	*	nz
	koža	0,01±0,01 <sup>bx</sup>	0,01±0,01 <sup>abx</sup>	0,01±0,00 <sup>ax</sup>	0,01±0,00 <sup>abx</sup>	0,02±0,00 <sup>ax</sup>			
C20:5c-5,8,11,14,17	maščoba	0,03±0,01 <sup>bx</sup>	0,05±0,01 <sup>ax</sup>	0,03±0,01 <sup>by</sup>	0,04±0,02 <sup>abx</sup>	0,03±0,01 <sup>bx</sup>	*	***	nz
	koža	0,03±0,01 <sup>bx</sup>	0,06±0,02 <sup>ax</sup>	0,05±0,00 <sup>ax</sup>	0,04±0,01 <sup>abx</sup>	0,05±0,02 <sup>ax</sup>			
C22:2c-13,16	maščoba	0,01±0,01 <sup>bex</sup>	0,01±0,02 <sup>bex</sup>	0,00±0,00 <sup>cy</sup>	0,02±0,02 <sup>abx</sup>	0,03±0,02 <sup>ax</sup>	nz	*	nz
	koža	0,02±0,01 <sup>ax</sup>	0,02±0,02 <sup>ax</sup>	0,01±0,00 <sup>x</sup>	0,02±0,01 <sup>ax</sup>	0,02±0,01 <sup>ax</sup>			

**Nadaljevanje preglednice 12.**

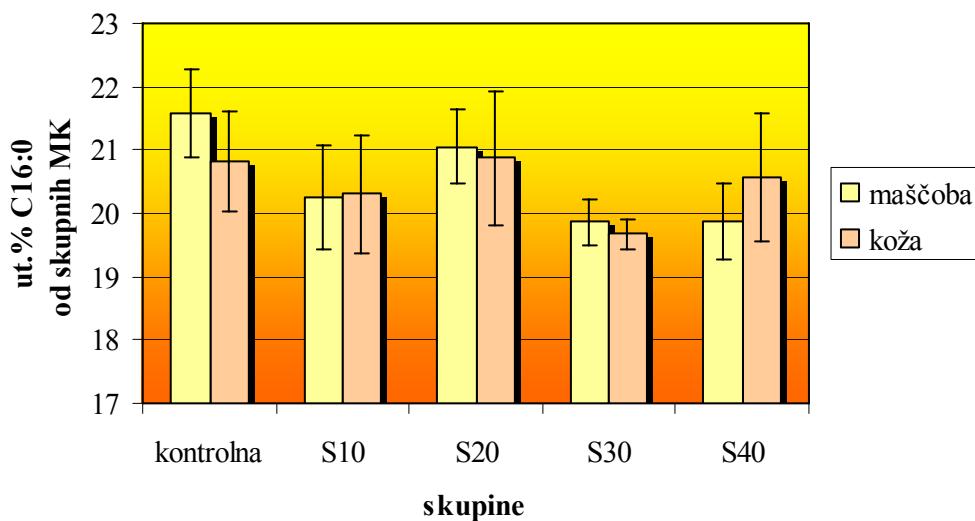
Parameter	tkivo	dodatek Q <sub>10</sub> ( $\bar{x} \pm so$ )					T	D	T*D
		kontrolna	S10	S20	S30	S40			
C24:0	maščoba	0,03±0,02 <sup>aby</sup>	0,05±0,03 <sup>abx</sup>	0,02±0,01 <sup>by</sup>	0,06±0,03 <sup>ax</sup>	0,04±0,02 <sup>abx</sup>	nz	nz	**
	koža	0,06±0,02 <sup>ax</sup>	0,03±0,01 <sup>bx</sup>	0,04±0,01 <sup>bx</sup>	0,03±0,01 <sup>bx</sup>	0,04±0,01 <sup>bx</sup>			
C24:1c-9	maščoba	0,05±0,00 <sup>cy</sup>	0,07±0,01 <sup>abcy</sup>	0,06±0,01 <sup>bey</sup>	0,08±0,02 <sup>ay</sup>	0,08±0,01 <sup>aby</sup>	***	***	nz
	koža	0,10±0,01 <sup>bx</sup>	0,12±0,02 <sup>abx</sup>	0,11±0,01 <sup>abx</sup>	0,13±0,03 <sup>ax</sup>	0,10±0,01 <sup>bx</sup>			
C22:5c-7,10,13,16,19	maščoba	0,04±0,00 <sup>ay</sup>	0,04±0,00 <sup>ay</sup>	0,04±0,00 <sup>ay</sup>	0,05±0,02 <sup>ay</sup>	0,05±0,01 <sup>ay</sup>	***	nz	nz
	koža	0,07±0,01 <sup>ax</sup>	0,09±0,01 <sup>ax</sup>	0,08±0,01 <sup>ax</sup>	0,09±0,02 <sup>ax</sup>	0,08±0,01 <sup>ax</sup>			
C22:6c-4,7,10,13,16,19	maščoba	0,01±0,00 <sup>by</sup>	0,02±0,00 <sup>aby</sup>	0,01±0,00 <sup>aby</sup>	0,02±0,01 <sup>ay</sup>	0,02±0,00 <sup>aby</sup>	***	***	nz
	koža	0,02±0,00 <sup>cx</sup>	0,04±0,00 <sup>abx</sup>	0,03±0,01 <sup>bex</sup>	0,05±0,02 <sup>ax</sup>	0,03±0,00 <sup>bex</sup>			
NMK	maščoba	28,29±1,16 <sup>ax</sup>	26,87±0,99 <sup>bex</sup>	27,54±0,94 <sup>abx</sup>	26,34±0,33 <sup>bex</sup>	26,02±0,98 <sup>cx</sup>	nz	**	nz
	koža	27,45±1,26 <sup>ax</sup>	27,19±1,42 <sup>ax</sup>	27,54±1,12 <sup>ax</sup>	26,41±0,67 <sup>ax</sup>	27,04±1,36 <sup>ax</sup>			
ENMK	maščoba	37,86±0,50 <sup>bx</sup>	38,56±1,60 <sup>abx</sup>	38,63±0,99 <sup>abx</sup>	37,27±1,18 <sup>bx</sup>	39,46±0,22 <sup>ax</sup>	nz	***	nz
	koža	37,58±0,48 <sup>ax</sup>	38,29±2,36 <sup>ax</sup>	38,68±1,49 <sup>ax</sup>	35,65±0,87 <sup>by</sup>	39,15±0,27 <sup>ax</sup>			
VNMK	maščoba	33,86±0,68 <sup>bx</sup>	34,57±1,78 <sup>bx</sup>	33,83±0,50 <sup>bx</sup>	36,39±0,99 <sup>ay</sup>	34,51±0,77 <sup>bx</sup>	nz	***	nz
	koža	34,97±1,02 <sup>bx</sup>	34,52±1,93 <sup>bx</sup>	33,77±1,33 <sup>bx</sup>	37,94±0,94 <sup>ax</sup>	33,81±1,10 <sup>bx</sup>			
P/S	maščoba	1,20±0,07 <sup>cx</sup>	1,29±0,10 <sup>bex</sup>	1,23±0,05 <sup>cx</sup>	1,38±0,03 <sup>ax</sup>	1,33±0,08 <sup>abx</sup>	nz	***	nz
	koža	1,28±0,09 <sup>bx</sup>	1,27±0,10 <sup>bx</sup>	1,23±0,08 <sup>bx</sup>	1,44±0,06 <sup>ax</sup>	1,25±0,10 <sup>bx</sup>			
n-6	maščoba	31,13±0,73 <sup>bx</sup>	30,64±1,54 <sup>bx</sup>	30,56±1,41 <sup>bx</sup>	32,70±1,23 <sup>ay</sup>	30,67±0,68 <sup>bx</sup>	*	***	nz
	koža	31,78±1,00 <sup>bx</sup>	31,38±1,69 <sup>bx</sup>	30,73±1,12 <sup>bx</sup>	34,52±0,47 <sup>ax</sup>	30,62±0,92 <sup>bx</sup>			
n-3	maščoba	2,20±0,43 <sup>cx</sup>	2,40±0,68 <sup>bex</sup>	2,80±0,10 <sup>abx</sup>	2,90±0,05 <sup>abx</sup>	2,96±0,22 <sup>ax</sup>	nz	*	*
	koža	2,51±0,13 <sup>ax</sup>	2,51±0,34 <sup>ax</sup>	2,45±0,18 <sup>ay</sup>	2,49±0,06 <sup>ay</sup>	2,55±0,19 <sup>ay</sup>			
n-6/n-3	maščoba	14,57±2,47 <sup>ax</sup>	13,59±3,67 <sup>abx</sup>	10,96±0,86 <sup>bey</sup>	11,27±0,49 <sup>bey</sup>	10,38±0,72 <sup>cy</sup>	nz	**	**
	koža	12,67±0,67 <sup>bx</sup>	12,67±1,42 <sup>bx</sup>	12,6±0,54 <sup>bx</sup>	13,87±0,45 <sup>ax</sup>	12,05±0,64 <sup>bx</sup>			
IA	maščoba	0,33±0,02 <sup>ax</sup>	0,30±0,02 <sup>bex</sup>	0,31±0,01 <sup>abx</sup>	0,29±0,01 <sup>cx</sup>	0,29±0,02 <sup>cx</sup>	nz	***	nz
	koža	0,31±0,02 <sup>ax</sup>	0,30±0,02 <sup>abx</sup>	0,31±0,02 <sup>abx</sup>	0,29±0,00 <sup>bx</sup>	0,31±0,02 <sup>abx</sup>			
holesterol	maščoba	136,03±1,89 <sup>by</sup>	155,09±3,98 <sup>ax</sup>	123,24±12,91 <sup>cy</sup>	119,46±1,78 <sup>cy</sup>	107,85±1,43 <sup>dx</sup>	***	***	***
	koža	171,74±0,92 <sup>ax</sup>	149,32±7,41 <sup>bx</sup>	139,74±8,54 <sup>cx</sup>	126,93±2,20 <sup>dx</sup>	104,87±4,23 <sup>ex</sup>			

n – število obravnavanj v skupini,  $\bar{x}$  – povprečna vrednost, so – standardni odklon, T – vpliv analiziranega tkiva (maščobe in kože); D – vpliv dodatka koencima Q<sub>10</sub> v krmu, T\*D – interakcija vrste tkiva in dodatka koencima Q<sub>10</sub>, NMK so nasičene maščobne kisline, ENMK so nenasičene maščobne kisline, ENMK so enkrat nenasicičene maščobne kisline razmerje, P/S je razmerje med VNMK in NMK, n-3 maščobne kisline vključujejo: 18:3c-9,12,15, 18:4c-6,9,12,15, 20:5c-5,8,11,14,17, 22:5c-7,10,13,16,19 in 22:6c-4,7,10,13,16,19; n-6 maščobne kisline vključujejo: 18:2c-9,12, 18:3c-6,9,12, 20:3c-8,11,14, 20:4c-5,8,11,14, 22:2c-13,16 in 22:4c-7,10,13,16. Indeks aterogenosti (IA) = (C12:0 + 4 C14:0 + C16:0)/(Σ(n-6) + Σ(n-3) + C18:1c-9 + ostale ENMK) (Ulbricht in Southgate, 1991). \*\*\*  $p \leq 0,001$  statistično zelo visoko značilen vpliv, \*\*  $p \leq 0,01$  statistično visoko značilen vpliv, \*  $p \leq 0,05$  statistično značilen vpliv, nz –  $p > 0,05$  statistično neznačilen vpliv, <sup>x,y</sup> vrednosti z enako nadpisano črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno ne razlikujejo, a,b,c,d,e vrednosti z enako nadpisano črko znotraj vrstice se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

Na vsebnost NMK v koži in maščobi ima dodatek koencima Q<sub>10</sub> statistično visoko značilen vpliv, medtem ko tkivo ter interakcija tkiva in dodatka statistično značilno ne vplivata na njihovo vsebnost (preglednica 12). Kljub temu, da se vsebnosti NMK v koži med posameznimi skupinami med seboj statistično značilno ne razlikujejo, je iz slike 34 razvidno, da se vsebnost NMK glede na kontrolno skupino nekoliko zmanjša že takoj po dodatku koencima Q<sub>10</sub> (skupina S10), najmanjšo vsebnost pa doseže v skupini S30. V skupini S20 vsebnost NMK tako v koži kot tudi v maščobi naraste. Vsebnost NMK v piščančji maščobi kontrolne skupine je statistično značilno večja (28,29 ut.%) v primerjavi z ostalimi skupinami (S10, S30 in S40), ki se med seboj statistično značilno zmanjšujejo.



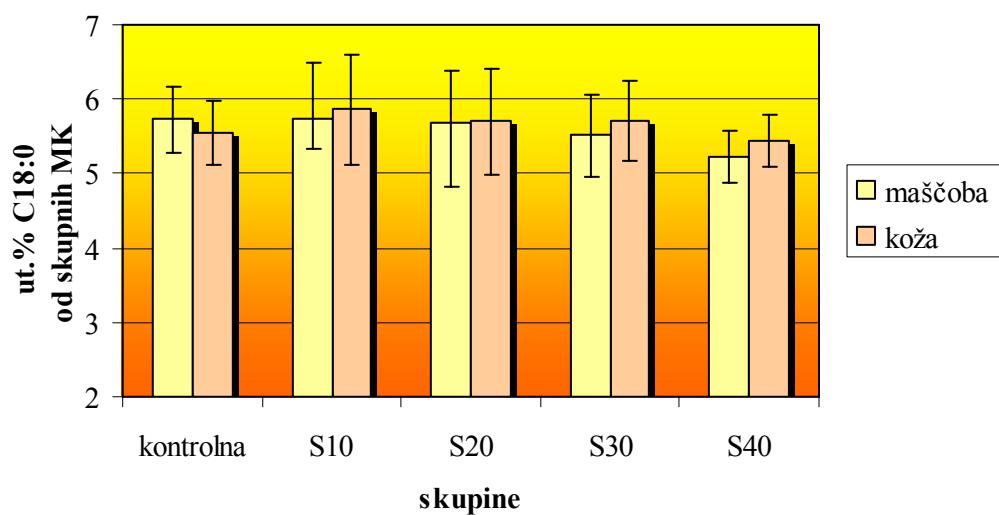
**Slika 34:** Vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo na vsebnost nasičenih maščobnih kislin (NMK).



**Slika 35:** Vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo na vsebnost palmitinske kisline (C16:0).

Glavna NMK v maščobi in koži je palmitinska kislina (C16:0), na katero ima dodatek koencima Q<sub>10</sub> statistično zelo visoko značilen vpliv, tkivo ter interakcija tkiva in dodatka pa kažeta statistično neznačilen vpliv. Tako v koži kot v maščobi se vsebnosti palmitinske kisline (C16:0) v kontrolni skupini in skupini S20 med seboj statistično značilno ne razlikujeta ter dosežeta statistično značilno večje vsebnosti v primerjavi s skupinami S40, S30 in S10 (slika 35).

Nekoliko manj zastopana NMK v koži in maščobi je stearinska kislina (C18:0). Vsi parametri (dodatek koencima Q<sub>10</sub>, tkivo ter interakcija tkiva in dodatka) kažejo statistično neznačilen vpliv na njeno vsebnost v koži in maščobi. Iz slike 36 je razvidno, da pride do neznatnega zmanjšanja stearinske kisline (C18:0) v koži in maščobi šele v skupini S40.

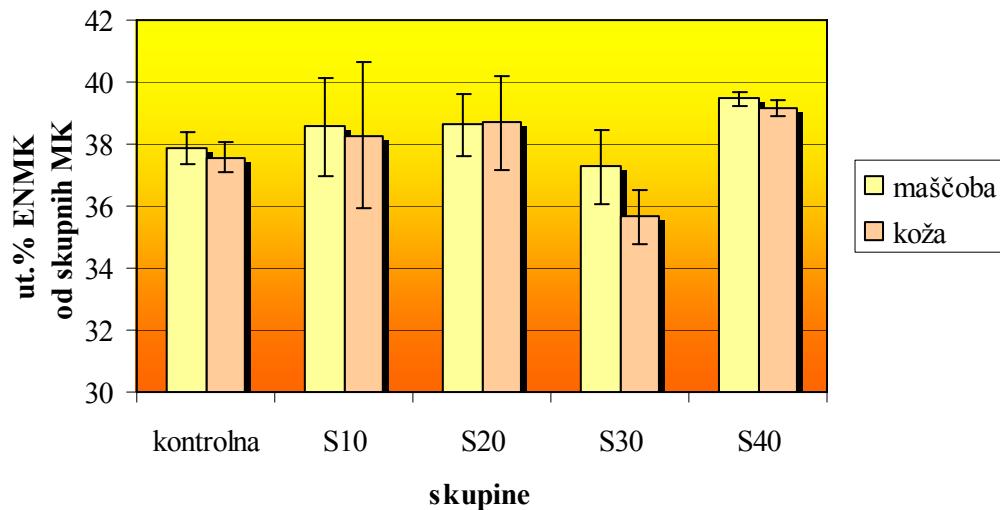


**Slika 36: Vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo na vsebnost stearinske kisline (C18:0).**

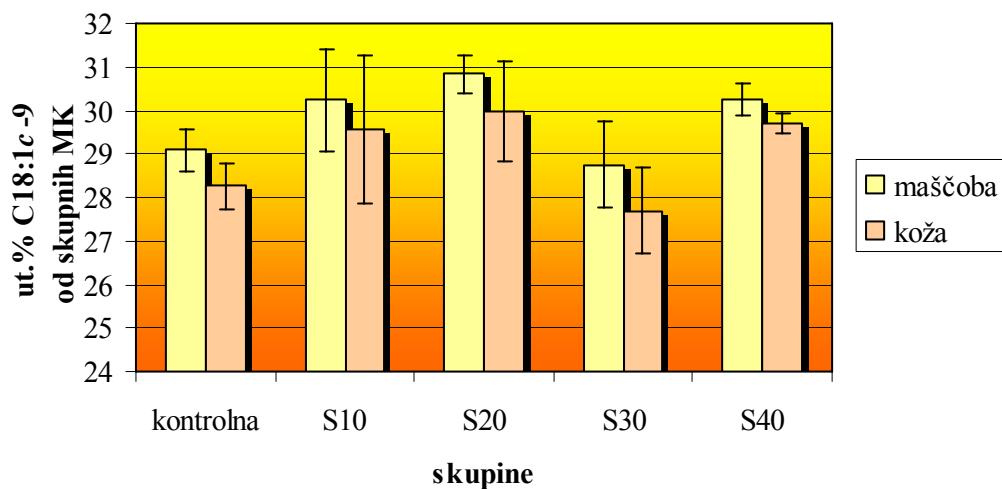
Najmanjši delež med NMK predstavlja miristinska kislina (C14:0), na katero ima dodatek koencima Q<sub>10</sub> statistično zelo visoko značilen vpliv, tkivo pa statistično neznačilno vpliva na njeno vsebnost. Statistično značilno največjo vsebnost miristinske kisline (C14:0) v koži in maščobi ima kontrolna skupina (0,49 ut. %). Najmanjša vsebnost je dosežena v skupini S10, ki pa se statistično značilno ne razlikuje od ostalih skupin (S20, S30 in S40).

Največji delež skupnih MK predstavljajo ENMK, na vsebnost katerih ima dodatek koencima Q<sub>10</sub> statistično zelo visoko značilen vpliv, tkivo ter interakcija tkiva in dodatka pa kažeta statistično neznačilen vpliv. Slika 37 prikazuje naraščanje ENMK v koži in maščobi, v skupini S30 pa pride do zmanjšanja ENMK, ki se statistično značilno razlikuje glede na ostale skupine. Pri maščobi je statistično značilno največja vsebnost (39,46 ut. %)

dosežena v skupini S40. Koža prav tako doseže največjo vsebnost v skupini S40, ki pa se statistično značilno ne razlikuje od ostalih skupin (kontrolna, S20 in S10).



**Slika 37:** Vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo na vsebnost ENMK.



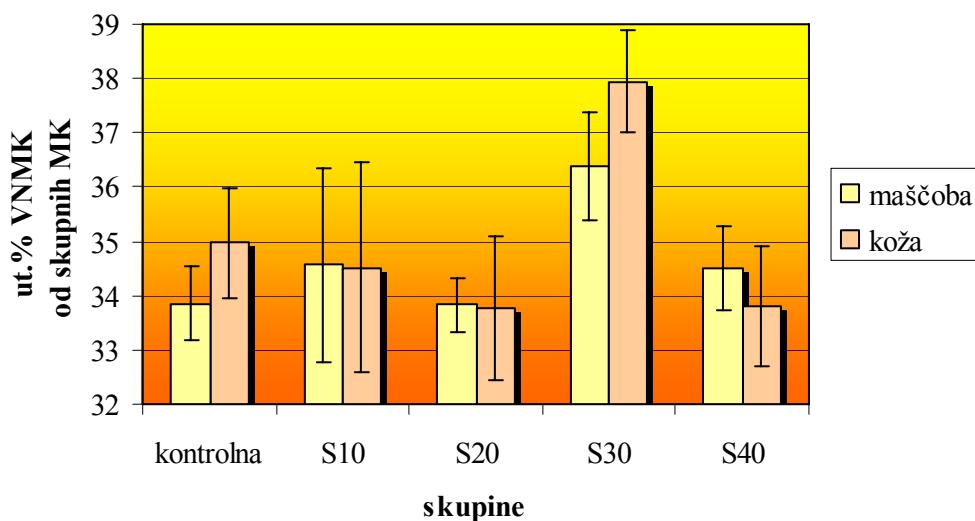
**Slika 38:** Vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo na vsebnost oleinske kisline (C18:1c-9).

Med ENMK največji delež pripada oleinski kislini (C18:1c-9). Na njeno vsebnost v maščobi in koži ima statistično zelo visoko značilen vpliv dodatek koencima Q<sub>10</sub>, statistično visok vpliv ima tkivo, interakcija tkiva in dodatka pa statistično neznačilen vpliv. Vsebnosti oleinske kisline (C18:1c-9) v maščobi in koži se v skupinah S40, S20 in

S10 statistično značilno ne razlikujejo in dosegajo statistično značilno večje vrednosti v primerjavi s kontrolno skupino in skupino S30. Iz slike 38 je razvidno, da pride v skupini S30 pri koži in maščobi do padca v vsebnosti oleinske kislina (C18:1c-9), ki pa se statistično značilno ne razlikuje glede na kontrolno skupino.

Med ENMK spada, z bistveno manjšim deležem, tudi eikozaenojska kislina (C20:1c-8), na katero ima dodatek koencima Q<sub>10</sub> statistično zelo visoko značilen vpliv, tkivo kaže značilen vpliv, interakcija tkiva in dodatka pa statistično neznačilen vpliv.

Na vsebnost VNMK v maščobi in koži ima statistično zelo visoko značilen vpliv dodatek koencima Q<sub>10</sub>, medtem ko vrsta tkiva ter interakcija tkiva in dodatka kažeta statistično neznačilen vpliv. Maščoba in koža se v vsebnosti VNMK med seboj statistično značilno razlikujeta v skupini S30, kjer dosegata tudi statistično značilne večje vrednosti v primerjavi z ostalimi skupinami (slika 39).



**Slika 39: Vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo na vsebnost VNMK.**

Med VNMK velja omeniti linolno (C18:2c-9,12) in  $\alpha$ -linolensko kislino (C18:3c-9,12,15) ter EPK (C20:5c-5,8,11,14,17), DPK (C22:5c-7,10,13,16,19) in DHK (C22:6c-4,7,10,13,16,19). Največji delež predstavlja linolna kislina (C18:2c-9,12), na katero ima dodatek koencima Q<sub>10</sub> statistično zelo visoko značilen vpliv, tkivo statistično značilno vpliva na njeno vsebnost, interakcija tkiva in dodatka pa kaže statistično neznačilen vpliv. Maščoba in koža se v vsebnosti linolne kislino (C18:2c-9,12) med seboj statistično značilno razlikujeta v skupini S30 ter tam dosežeta statistično značilno večje vrednosti v primerjavi z ostalimi skupinami.

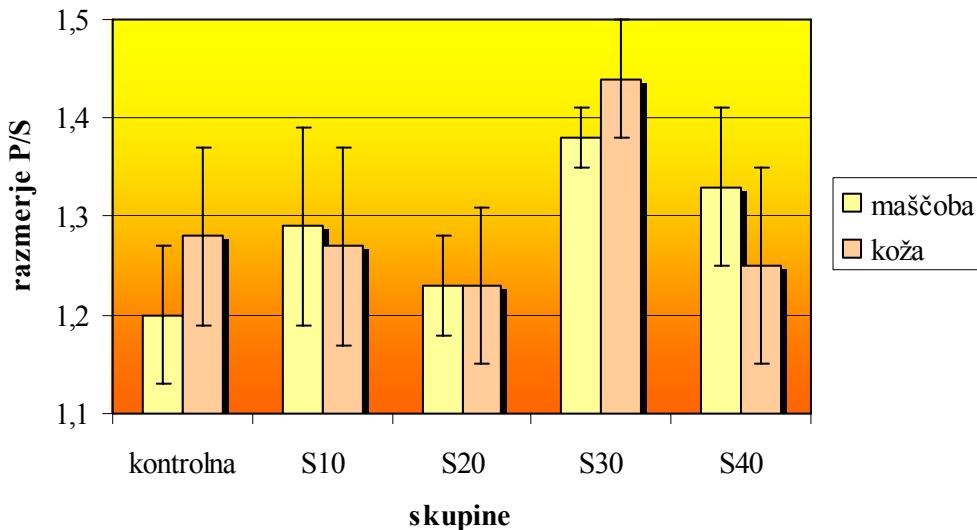
Dodatek koencima Q<sub>10</sub> ter interakcija tkiva in dodatka statistično značilno vplivata na vsebnost α-linolenske kisline (C18:3c-9,12,15). Skupine S40, S30 in S20 se pri koži in maščobi med seboj statistično značilno razlikujejo v vsebnosti α-linolenske kisline (C18:3c-9,12,15), kar je posledica statistično visoko značilnega vpliva tkiva. Maščoba statistično značilno največjo vsebnost α-linolenske kisline (C18:3c-9,12,15) doseže v skupini S40, koža pa v kontrolni skupini, vendar se statistično značilno ne razlikuje v njeni vsebnosti glede na ostale skupine.

Na vsebnost EPK (C20:5c-5,8,11,14,17) ima statistično zelo visoko značilen vpliv dodatek koencima Q<sub>10</sub>, tkivo kaže statistično značilen vpliv, interakcija tkiva in dodatka pa statistično neznačilen vpliv. Skupina S10 pri maščobi ima statistično značilno večjo vsebnost EPK v primerjavi z ostalimi skupinami. Skupine S40, S20 in S10 pri koži se med seboj statistično značilno ne razlikujejo v vsebnosti EPK ter tukaj dosežejo statistično značilne večje vrednosti glede na ostale skupine.

Tkivo ima statistično zelo visoko značilen vpliv na vsebnost DPK (C22:5c-7,10,13,16,19), ostala dva parametra imata statistično neznačilen vpliv. Vsebnosti DPK se v maščobi in koži med seboj statistično značilno razlikujejo.

Tkivo ima statistično zelo visoko značilen vpliv tudi na vsebnost DHK (C22:6c-4,7,10,13,16,19), kar pomeni, da se vsebnosti DHK v maščobi in koži med seboj statistično značilno razlikujejo. Statistično zelo visoko značilen vpliv kaže tudi dodatek koencima Q<sub>10</sub>, medtem ko vpliv interakcije tkiva in dodatka na vsebnost DHK ni statistično značilen.

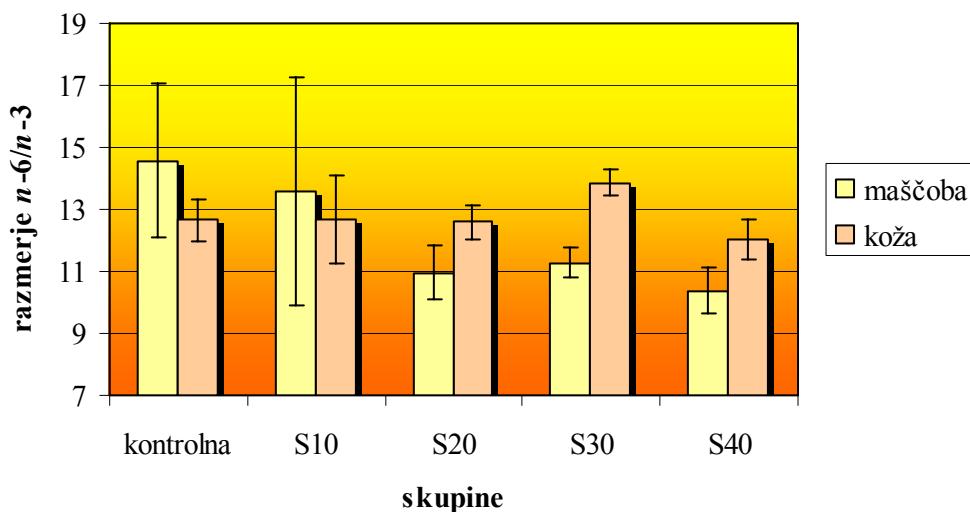
Na razmerje med VNMK in NMK (P/S) ima statistično zelo visoko značilen vpliv dodatek koencima Q<sub>10</sub>. P/S se med posameznimi skupinami v maščobi statistično značilno razlikuje, statistično značilno največjo vrednost pa doseže v skupini S30 (1,38). Koža prav tako v skupini S30 doseže statistično značilno večjo vrednost P/S glede na ostale skupine. Tkivo ter interakcija tkiva in dodatka kažeta statistično neznačilen vpliv na razmerje P/S (slika 40).



**Slika 40:** Vpliv dodanega koencima  $Q_{10}$  v krmo na razmerje P/S.

Dodatek koencima  $Q_{10}$  statistično zelo visoko značilno vpliva na vsebnost  $n\text{-}6$  MK, vpliv tkiva je statistično značilen, interakcija tkiva in dodatka pa statistično neznačilna. Največja vsebnost  $n\text{-}6$  MK v maščobi in koži je dosežena v skupini S20, vrednosti se med seboj statistično značilno razlikujeta.

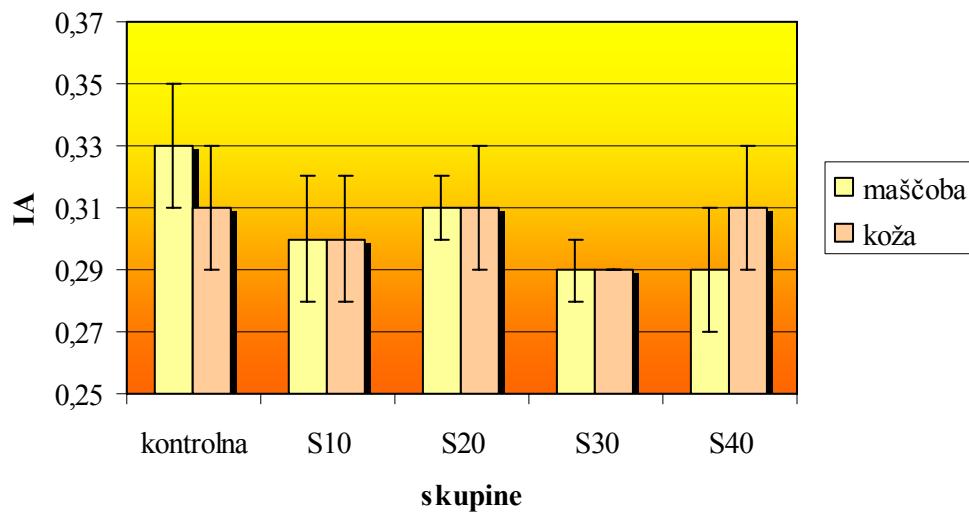
Na  $n\text{-}3$  MK imata dodatek koencima  $Q_{10}$  ter interakcija tkiva in dodatka statistično značilen vpliv, tkivo pa statistično neznačilnega. Vsebnosti  $n\text{-}3$  MK se v koži po posameznih skupinah statistično značilno ne razlikujejo. Največja vsebnost  $n\text{-}3$  MK v maščobi je dosežena v skupini S40 in se statistično značilno razlikuje od ostalih skupin.



**Slika 41:** Vpliv dodanega koencima  $Q_{10}$  v krmo na razmerje  $n\text{-}6/n\text{-}3$ .

Na razmerje  $n-6/n-3$  statistično visoko značilno vplivata dodatek koencima  $Q_{10}$  ter interakcija tkiva in dodatka. Vpliv tkiva je statistično neznačilen. V koži doseže razmerje najmanjšo vrednost v skupini S40, ki se statistično značilno ne razlikuje od kontrolne skupine, skupine S20 in skupine S10. Najmanjše razmerje  $n-6/n-3$  v maščobi je prav tako doseženo v skupini S40, ki pa se statistično značilno razlikuje od ostalih skupin (slika 41).

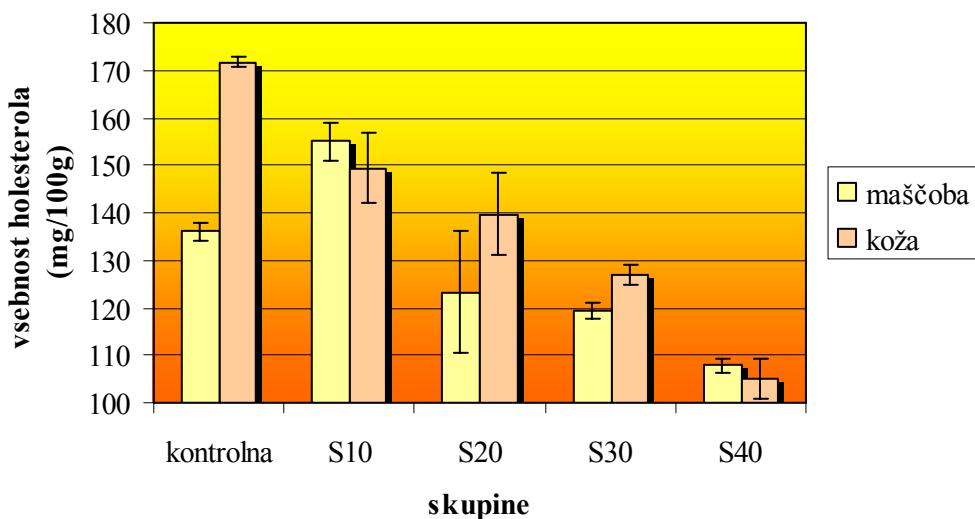
Tkivo ter interakcija tkiva in dodatka statistično neznačilno vplivata na vrednost indeksa aterogenosti (IA). Torej se vsebnosti v maščobi in koži v posameznih skupinah med seboj statistično značilno ne razlikujejo. Statistično zelo visoko značilen vpliv na vrednost IA ima dodatek koencima  $Q_{10}$  v maščobi. Najmanjšo vrednost IA v maščobi doseže v skupini S30, ki pa se statistično značilno ne razlikuje od skupine S40. V koži ima IA statistično značilno najmanjšo vrednost v skupini S30 (0,29) (slika 42).



**Slika 42: Vpliv dodanega koencima  $Q_{10}$  v krmo na vrednost IA.**

#### 4.3.6 Vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo na vsebnost holesterola v piščančji koži in maščobi

Vsi trije parametri, tako tkivo, dodatek koencima Q<sub>10</sub>, kot tudi interakcija tkiva in dodatka statistično zelo visoko značilno vplivajo na vsebnost holesterola v maščobi in koži (preglednica 12). V koži ima holesterol v kontrolni skupini statistično značilno največjo vrednost (171,74 mg/100 g), po skupinah S10, S20, S30 in S40 pa se vsebnosti statistično značilno zmanjšujejo (slika 43). Maščoba ima statistično značilno največjo vsebnost holesterola v skupini S10 (155,09 mg/100 g), najmanjšo pa doseže v skupini S40 (107,85 mg/100 g) in se statistično značilno razlikuje od ostalih skupin. Maščoba in koža se v vsebnosti holesterola med seboj statistično značilno ne razlikujeta v skupinah S40 in S10, medtem ko v ostalih skupinah prihaja do statistično značilnih razlik.



**Slika 43:** Vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo na vsebnost holesterola.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo piščancev na njegovo vsebnost v koži in abdominalni maščobi. Prav tako smo želeli preveriti morebitne spremembe v maščobnokislinski sestavi in vsebnosti holesterola.

Metoda, ki se uporablja za določanje koencima Q<sub>10</sub> v mesu, se je izkazala za neuspešno pri določanju v piščančji koži in abdominalni maščobi. Zaradi velike količine veziva v vzorcih (koža in maščoba), smo imeli probleme že s samo homogenizacijo. Destilirano vodo smo v procesu homogenizacije nadomestili z 0,5 M raztopino NaCl. Prav tako smo ekstrakcijsko topilo kloroform, zaradi njegove škodljive narave za zdravje, zamenjali z manj škodljivim in primerno učinkovitim dietiletrom. Maščobo, glavno motečo komponento pri kvantifikaciji koencima Q<sub>10</sub>, smo iz ekstrakta kože oz. maščobe odstranili s postopkom SPE (ekstrakcija s trdno fazo) ter pri tem uporabili kolono Supelclean™ ENVI™ Florisil®. Na ta način smo razvili metodo za določanje koencima Q<sub>10</sub> v maščobno bogatih tkivih, kot sta piščančja koža in maščoba. Ustreznost metode smo potrdili s procesom validacije.

Z razvojem metode za določanje koencima Q<sub>10</sub> v piščančji koži in maščobi, kjer ima ključno vlogo uporaba florisila, smo v prihodnje omogočili določanje vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> v maščobno bogatih tkivih drugih živali in mesnih izdelkih.

Vsebnost koencima Q<sub>10</sub> v piščančji koži in maščobi smo določili z metodo, opisano v poglavju 3.2.1, ter prišli do zanimivih rezultatov. Pokazali smo, da je vsebnost koencima Q<sub>10</sub> v piščančji koži in maščobi bistveno manjša v primerjavi z oksidativno aktivnimi mišicami, kot so npr. srce, jetra in ledvica, kjer dosega koencim Q<sub>10</sub> največje vrednosti. Za nazornejšo primerjavo lahko navedemo primer iz literature, kjer človeška srčna mišica vsebuje približno 114 µg/g koencima Q<sub>10</sub> (primerljivo z vsebnostjo v srcu piščanca), povprečne vsebnosti koencima Q<sub>10</sub>, določene v naših vzorcih, pa se gibljejo med 2,12 µg/g v maščobi in 5,52 µg/g v koži, torej dosegajo vsaj 20-krat manjše vrednosti.

Prav tako smo v koži določili večjo vsebnost koencima Q<sub>10</sub> v primerjavi z maščobo. To lahko pojasnimo z dejstvom, da kožno tkivo sestavlja veliko število majhnih, zbitih celic, za maščobno tkivo pa je značilno manjše število večjih, okroglih celic. Glede na to, da je večina koencima Q<sub>10</sub> prisotnega v celičnih membranah, je njegova vsebnost, gledano na enoto površine, večja v koži.

Predvidevali smo, da bo dodatek koencima Q<sub>10</sub> v krmo piščancev privedel do povečanja njegove vsebnosti v koži in maščobi, izkazalo pa se je ravno obratno. Koncentracija koencima Q<sub>10</sub> se je tako v koži kot v maščobi namreč že po 10-dnevnom krmljenju

piščancev s koencimom Q<sub>10</sub> zmanjšala za tretjino, po 20- in 30-dnevnom krmljenju pa za več kot polovico. Po 40-dneh krmljenja s koencimom Q<sub>10</sub> je prišlo ponovno do dviga v njegovi vsebnosti.

Ena izmed verjetnih razlag, zakaj dodatek koencima Q<sub>10</sub> vpliva na zmanjšanje njegove vsebnosti v tkivih (koža oz. maščoba) je ta, da koencim Q<sub>10</sub> sodeluje pri regulaciji permeabilnosti membrane. Večja količina koencima Q<sub>10</sub> pomeni večjo permeabilnost membrane. Večja permeabilnost pa omogoča večji dostop vode v celico ter s tem posledično privede do zmanjšanja vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> na g tkiva.

Na osnovi dobljenih rezultatov se pojavi vprašanje o smiselnosti uživanja koencima Q<sub>10</sub> kot prehranskega dodatka. Če se omejimo predvsem na kožo ter upoštevamo teorijo, da koencim Q<sub>10</sub> vpliva na povečanje permeabilnosti membrane (večja količina vode v celici in posledično bolj napeta koža), lahko govorimo o učinkovitem uživanju koencima Q<sub>10</sub>.

Maščobnokislinsko sestavo kože in maščobe smo določili z metodo, modificirano po Park in Goinsu (1994). Dobljene rezultate smo primerjali z literurnimi (preglednica 13) in ugotovili, da se MK v večini dobro ujemajo, odstopanja so predvsem posledica različne krme piščancev. Do največjih odstopanj prihaja v vsebnosti linolne kisline (C18:2c-9,12), s tem posledično pa tudi v vsebnosti VNMK, na osnovi česar lahko sklepamo, da je bila krma naših piščancev bogata z linolno kislino.

Čeprav nikjer v literaturi nismo zasledili povezave med maščobnimi kislinami in koencimom Q<sub>10</sub>, smo na osnovi rezultatov ugotovili, da dodatek koencima Q<sub>10</sub> v krmo piščancev značilno vpliva na maščobnokislinsko sestavo kože in maščobe.

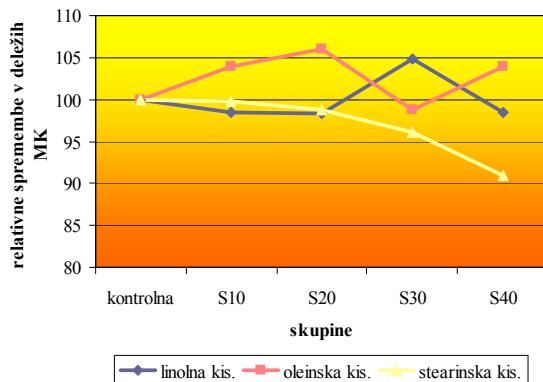
Najbolj zastopane NMK v koži in maščobi so palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0) in miristinska kislina (C14:0). Zmanjšanje vsebnosti miristinske in palmitinske kisline v koži in maščobi nastopi že po 10-dnevnom krmljenju s koencimom Q<sub>10</sub>, nasprotno pa se vsebnost stearinske kisline (C18:0) nekoliko zmanjša šele v skupini S30 (po 30 dneh krmljenja s koencimom Q<sub>10</sub>) (slika 44). Dogajanje lahko pojasnimo s podatki iz literature, ki kažejo na poseben in močno reguliran metabolizem stearinske kisline (C18:0) v primerjavi z ostalimi maščobnimi kislinami (Harwood, 1994).

**Preglednica 13: Maščobnokislinska sestava piščančje kože in maščobe; primerjava dobljenih rezultatov z literurnimi.**

<b>Parameter</b>	<b>vsebnost MK (ut. % od skupnih MK)</b>				
	tkivo	dobljeni rezultati	Fatty Acids, 1998	Cintra in sod., 2006	Golob in sod., 2006
C14:0 (miristinska kislina)	maščoba	0,49	-	-	0,73
	koža	0,49	0,90	0,55	-
C16:0 (palmitinska kislina)	maščoba	21,59	-	-	19,7
	koža	20,82	21,6	29,69	-
C18:0 (stearinska kislina)	maščoba	5,75	-	-	8,70
	koža	5,54	6,10	6,43	-
C18:1c-9 (oleinska kislina)	maščoba	29,09	-	-	37,00
	koža	28,26	44,1	38,09	-
C18:2c-9,12 (linolna kislina)	maščoba	31,06	-	-	26,30
	koža	31,74	14,3	16,60	-
C18:3c-9,12,15 ( $\alpha$ -linolenska kislina)	maščoba	2,01	-	-	1,71
	koža	2,26	2,30	0,62	-
C20:1c-8 (eikozaenojska kislina)	maščoba	0,31	-	-	-
	koža	0,31	0,51	0,69	-
NMK (nasičene maščobne kisline)	maščoba	28,29	-	-	29,13
	koža	27,45	29,3	37,02	-
ENMK (enkrat nenasičene MK)	maščoba	37,86	-	-	41,71
	koža	37,58	50,6	45,21	-
VNMK (večkrat nenasičene MK)	maščoba	33,86	-	-	28,01
	koža	34,97	17,3	17,77	-
n-3	maščoba	2,20	-	-	1,71
	koža	2,51	2,90	-	-
n-6	maščoba	31,13	-	-	26,30
	koža	31,78	14,7	-	-

Z dodatkom koencima Q<sub>10</sub> se spreminja tudi vsebnosti EMNK in VNMK, posledično pa razmerje P/S. Iz slike 44 je lepo razvidno odstopanje v vsebnosti oleinske (C18:1c-9) in linolne kisline (C18:2c-9,12) v skupini S30. Pri oleinski kislini (C18:1c-9) pride tako v koži kot v maščobi do zmanjšanja, medtem ko se vsebnost linolne kisline (C18:2c-9,12) nekoliko poveča. Podobno se dogaja tudi z  $\alpha$ -linolensko kislino (C18:3c-9,12,15), katera največjo vsebnost doseže šele v skupini S40. Krmljenje s koencimom Q<sub>10</sub> ima učinek tudi

na EPK (C20:5c-5,8,11,14,17), DPK (C22:5c-7,10,13,16,19) in DHK (C22:6c-4,7,10,13,16,19), ki so v koži in maščobi zastopane v nekoliko manjših količinah.



**Slika 44: Relativne spremembe v vsebnosti posameznih MK po različno dolgem krmljenju s koencimom Q<sub>10</sub>.**

Vsebnost n-3 maščobnih kislin se v koži praktično ne spreminja, v maščobi pa največjo vrednost doseže po 40-dnevnom krmljenju s koencimom Q<sub>10</sub>. Nekoliko večji vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> se kaže v vsebnosti n-6 maščobnih kislin, katere v koži in maščobi dosežejo največjo vrednost v skupini S30. Razmerje med n-6 in n-3 MK se v koži in maščobi nekoliko zmanjša. Prav tako dodatek koencima Q<sub>10</sub> privede do zmanjšanja vrednosti IA tako v koži kot v maščobi.

Za določanje holesterola smo uporabili modificirano metodo po Naeemi-ju (Naeemi in sod., 1995). V koži smo v povprečju določili 138,52 mg/100 g, v maščobi pa 128,33 mg/100 g holesterola. Glede na to, da sta biosintezni poti holesterola in koencima Q<sub>10</sub> med seboj povezani (preko mevalonatne poti), smo pričakovali, da bo dodatek koencima Q<sub>10</sub> v krmo piščancev vplival na vsebnost holesterola v koži in maščobi.

Na osnovi rezultatov smo prišli do ugotovitve, da se vsebnost holesterola v koži in maščobi, sorazmerno s časom dodajanja koencima Q<sub>10</sub> v krmo, zmanjšuje.

Sklepamo lahko, da presežek zaužitega koencima Q<sub>10</sub> verjetno privede do zmanjšanega delovanja encima HMG-CoA reduktaze (glavnega regulatornega encima v začetnih fazah biosinteze holesterola in koencima Q<sub>10</sub>), na ta način pride do zmanjšanja biosinteze koencima Q<sub>10</sub>, posledično pa se kaže vpliv tudi na biosintezo holesterola.

Čeprav so bile raziskave narejene na piščancih, ne smemo izključiti možnosti, da bi se lahko koencim Q<sub>10</sub> v prihodnosti uporabljal kot neke vrste statin (inhibitor HMG-CoA reduktaze) pri ljudeh.

## 5.2 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- Razvili smo metodo za določanje koencima Q<sub>10</sub> v maščobno bogatih tkivih piščancev, kjer predstavlja uporaba florisila edinstveno rešitev pri odstranitvi maščobe iz vzorca.
- S procesom validacije smo potrdili, da je naša metoda za določanje koencima Q<sub>10</sub> ustrezno selektivna, linearna in ponovljiva znotraj preiskovanega območja.
- Z razvojem nove metode smo v prihodnje omogočili določanje koencima Q<sub>10</sub> tudi v maščobno bogatih tkivih drugih živalskih vrst in mesnih izdelkih.
- V koži smo določili večjo vsebnost koencima Q<sub>10</sub> kot v maščobi; povprečna vsebnost koencima Q<sub>10</sub> v koži znaša 5,52 µg/g, v maščobi pa 2,12 µg/g.
- Dodatek koencima Q<sub>10</sub> v krmo piščancev privede do zmanjšanja njegove vsebnosti v koži in maščobi. V koži smo določili najmanjšo vsebnost koencima Q<sub>10</sub> po 30-dnevnom, v maščobi pa po 20-dnevnom krmljenju s koencimom Q<sub>10</sub>.
- Dokazali smo statistično značilen vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo piščancev na maščobnokislinsko sestavo kože in maščobe.
- Prav tako smo dokazali statistično zelo visoko značilen vpliv dodanega koencima Q<sub>10</sub> v krmo piščancev na vsebnost holesterola v koži in maščobi, ki se, sorazmerno z dolžino krmljenja, zmanjšuje.
- Za razumevanje podrobnejšega dogajanja v vsebnosti koencima Q<sub>10</sub> med posameznimi skupinami v piščančji koži in maščobi so potrebne nadaljnje raziskave.

## 6 POVZETEK

Koencim Q<sub>10</sub> je naravna, vitaminom podobna substanca, ki v današnjem času med potrošniki dobiva vse večji pomen kot prehransko dopolnilo ter s tem na učinkovit način prispeva k krepitvi našega organizma.

Namen naše raziskave je bil ugotoviti, kako dodatek koencima Q<sub>10</sub> v krmo piščancev vpliva na njegovo vsebnost v koži in abdominalni maščobi. Preveriti smo želeli tudi morebitne spremembe v maščobnokislinski sestavi in vsebnosti holesterola.

V poizkus je bilo vključenih 200 piščancev provenience Ross 308 in starosti 41 dni. Poskusne skupine so bile oblikovane glede na različno dolžino krmljenja piščancev z vodotopno obliko koencima Q<sub>10</sub> (0 dni, 10 dni, 20 dni, 30 dni in 40 dni).

Metoda za določanje koencima Q<sub>10</sub> v mišičnini, razvita na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, se je izkazala za pomanjkljivo v primeru določanja koencima Q<sub>10</sub> v maščobno bogatih tkivih, kot sta piščančja koža in maščoba. Posvetili smo se razvoju primernejše in učinkovitejše metode. Homogenizacijo vzorca (koža in maščoba) smo izvedli z uporabo 0,5 M raztopine NaCl, kot ekstrakcijsko topilo pa uporabili dietileter. Kjučna faza v razvoju metode je bila odstranitev glavnih motečih komponent (maščobe) iz vzorca; v ta namen smo izvedli ekstrakcijo s trdno fazo (SPE) in uporabili kolono Supelclean™ ENVI™ Florisil®.

Na osnovi rezultatov validacije smo ugotovili, da naša metoda izpolnjuje pogoje za določanje koencima Q<sub>10</sub> v maščobno bogatih tkivih piščancev.

V koži smo določili več koencima Q<sub>10</sub> kot v maščobi; koža vsebuje v povprečju 5,52 µg/g, maščoba pa 2,12 µg/g koencima Q<sub>10</sub>.

Pričakovali smo, da bo dodatek koencima Q<sub>10</sub> v krmo piščancev privедel do povečanja njegove vsebnosti v koži in maščobi s časovnim zamikom. Nasprotno pa so rezultati pokazali, da se z dodanim koencimom Q<sub>10</sub> njegova vsebnost zmanjša. Tako koža doseže najmanjšo vsebnost po 30-dnevnom, maščoba pa že po 20-dnevnom krmljenju s koencimom Q<sub>10</sub>.

Čeprav v literaturi nismo zasledili povezave med koencimom Q<sub>10</sub> in maščobnimi kislinami, smo dokazali, da dodatek koencima Q<sub>10</sub> značilno vpliva na maščobnokislinsko sestavo piščančje kože in maščobe. Potrdili smo tudi korelacijo med dodanim koencimom Q<sub>10</sub> in vsebnostjo holesterola. Dlje časa kot so bili piščanci krmljeni s koencimom Q<sub>10</sub>, manjša je bila vsebnost holesterola v koži in maščobi.

## 7 VIRI

- Aberg F., Appelqvist E.L., Dallner G., Ernster L. 1992. Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 295: 230-234
- Artuch R., Colome C., Vilaseca M.A., Sierra C., Cambra F.J., Lambruschini N., Campistol J. 2001. Plasma phenylalanine is associated with decreased ubiquinone-10 concentrations in phenyketonuria. *Journal of Inheritet Metabolic Disease*, 24: 359-366
- Barshop B.A., Gangoiti J.A. 2007. Analysis of coenzyme Q in human blood and tissues. *Mitochondrion*, 7, Suppl.1: S89-S93
- Battino M., Leone L., Bompadre S. 2004. High-performance liquid chromatography-EC assay of mitochondrial coenzyme Q9, coenzyme Q9H<sub>2</sub>, coenzyme Q10, coenzyme Q10H<sub>2</sub>, and vitamin E with a simplified on-line solid-phase extraction. *Methods in Enzymology*, 378: 156-162
- Bentinger M., Brismar K., Dallner G. 2007. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, 7, Suppl.1: S41-S50
- Bhagavan H.N., Chopra R.K. 2007. Plasma coenzyme Q10 response to oral ingestion of coenzyme Q10 formulations. *Mitochondrion*, 7, Suppl.1: S78-S88
- Biwer A., Antranikian G., Heinzle E. 2002. Enzymatic production of cyclodextrins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 609-617
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 450-486
- Brea-Calvo G., Rodriguez-Hernandez A., Fernandez-Ayala D.J., Navas P., Sanchez-Alcazar J.A. 2006. Chemotherapy induces an increase in coenzyme Q10 levels in cancer cell lines. *Free Radical Biology and Medicine*, 40: 1293-1302
- Brodnjak Vončina D. 2006. Analizna kemija II. Zbrano gradivo. Maribor, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 124 str.
- Burton G.W., Webb A., Ingold K.U. 1985. A mild, rapid and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios. *Lipids*, 20: 29-39
- Cintra D, Costa A., Peluzio M., Matta S., Silva M., Costa N. 2006. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin. *Nutrition*, 22, 2: 197-205
- Crane F.L. 2007. Discovery of ubiquinone (coenzyme Q) and an overview of function. *Mitochondrion*, 7, Suppl.1: S2-S7
- Crane F.L., Navas P. 1997. The diversity of coenzyme Q function. *Molecular Aspects of Medicine*, 18: 1-6
- Echtay K.S., Winkler E., Klingenberg M. 2000. Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature*, 408: 609-613
- Ernster L., Dallner G. 1995. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1271: 195-204

- Fatty Acids. 1998. Seventh supplement of the fifth edition of McCance and Widdowson's. The composition of foods. London, Royal Society of Chemistry: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food: 82-99
- Fidimed. 2005. Fidi coenzyme 10. Trzin, Fidimed <http://www.fidimed.si/> (maj 2008): 4 str.
- Finckh B., Kontush A., Commentz J., Hubner C., Burdelski M., Kohlschutter A. 1995. Monitoring of ubiquinol-10, ubiquinone-10, carotenoids and tocopherols in neonatal plasma microsamples using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. Analytical Biochemistry, 232: 210-216
- Fir M., Šmidovnik A., Golc-Wondra A., Polak T., Šmigoc V., Prošek M. 2008. The effect of supplemented coenzyme Q10 on chicken meat. Interno gradivo. Ljubljana, Kemijski inštitut: 16 str.
- Fontaine E., Eriksson O., Ichas F., Bernardi P. 1998. Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation by electron flow through the respiratory chain complex I. Journal of Biological Chemistry, 273: 12662-12668
- Garrett R.H., Grisham C.M. 2002. Principles of biochemistry with a human focus. Fort Worth, Harcourt College: 893 str.
- Gattuso G., Nepogodiev S.A., Stoddart F.J. 1998. Synthetic cyclic oligosaccharides. Chemical Reviews, 98: 1919-1958
- Ghirlanda G., Oradei A., Manto A., Lippa S., Uccioli L., Caputo S., Greco A.V., Littarri G.P. 1993. Evidence of plasma CoQ<sub>10</sub> -lowering effect by HMG-CoA reductase inhibitors: a double blind, placebo-controlled study. Journal of Clinical Pharmacology, 3: 226-229
- Golob, T., Stibilj V., Žlender B., Doberšek U., Jamnik M., Polak T., Salobir J., Čandek Potokar M. 2006. Slovenske prehranske tabele - meso in mesni izdelki. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 322 str.
- Grunler J., Ericsson J., Dallner G. 1994. Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins. Biochimica et Biophysica Acta, 1212: 259-277
- Gunstone F. 1996. Fatty acid and lipid chemistry. 1<sup>st</sup> ed. London, Chapman & Hall: 157-171
- Hansen G., Christensen P., Tuchsen E., Lund T. 2004. Sensitive and selective analysis of coenzyme Q10 in human serum by negative APCI LC-MS. Analyst, 129, 1: 45-50
- Hargreaves I.P. 2003. Ubiquinone: cholesterol's reclusive cousin. Annals of Clinical Biochemistry, 40: 207-218
- Hargreaves I.P. 2007. Coenzyme Q<sub>10</sub> in phenylketonuria and mevalonic aciduria. Mitochondrion, 7, Suppl.1: S175-S180
- Harwood J.L. 1994. Lipid metabolism. V: The lipid handbook. Gunstone F.D., Harwood J.L., Padley F.B. (eds.). New York, Chapman & Hall: 605-632
- Hosoe K., Kitano M., Kishida H., Kubo H., Fujii K., Kitahara M. 2007. Study on safety and bioavailability of ubiquinol (Kaneka QH<sup>TM</sup>) after single and 4-week multiple oral

administration to healthy volunteers. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 47: 19-28

Kaikkonen J., Tuomainen T.P., Nyysönen K., Salonen J.T. 2002. Coenzyme Q10: absorption, antioxidative properties, determinants and plasma levels. *Free Radical Research*, 36: 389-397

Kozlov A.V., Nohl H., Gille L. 1998. Are reduced ubiquinones oxygen radical generators? *Bioorganic Chemistry*, 26: 334-344

Landi L., Fiorentini D., Galli M.C., Segura-Aguilar J., Beyer R.E. 1997. DT-Diaphorase maintains the reduced state of ubiquinones in lipid vesicles thereby promoting their antioxidant function. *Free Radical Biology and Medicine*, 22: 329-335

Lass A., Sohal R.S. 2000. Effect of coenzyme Q<sub>10</sub> and alpha-tocopherol content of mitochondria on the production of superoxide anion radicals. *FASEB Journal*, 14: 87-94

Lenaz G., Fato R., Formiggini G., Genova M.L. 2007. The role of coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion*, 7, Suppl.1: S8-S33

Lenaz G., Samori B., Fato R., Battino M., Parenti Castelli G., Domini I. 1992. Localization and preferred orientations of ubiquinone homologs in model bilayers. *Biochemistry and Cell Biology*, 70, 6: 504-514

Littarru G.P., Langsjoen P. 2007. Coenzyme Q<sub>10</sub> and statins: Biochemical and clinical implications. *Mitochondrion*, 7, Suppl.1: S168-S174

Low P., Andersson M., Edlund C., Dallner G. 1992. Effects of mevinolin treatment on tissue dolichol and ubiquinone levels in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1165: 102-109

Low P., Peterson E., Edlund C., Brunk U., Appelkvist E.L. 1992. Nonmembrane associated dolichol in rat liver. *Lipids*, 27: 1-9

Marcoff L., Thompson P.D. 2007. The role of coenzyme Q10 in statin-associated Myopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 49, 23: 2231-2237

Marriage B.J., Clandinin M.T., Macdonald I.M., Glerum D.M. 2004. Cofactor treatment improves ATP synthesis capacity in patient with oxidative phosphorylation disorders. *Molecular Genetics and Metabolism*, 81: 263-272

Mason P. 2001. Dietary supplements. 2<sup>nd</sup> ed. London, Pharmaceutical Press: 59-61

Mohr D., Bowry V.W., Stocker R. 1992. Dietary supplementation with coenzyme Q10 results in increased levels of ubiquinol-10 within circulating lipoproteins and increased resistance of human low-density lipoprotein to the initiation of lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1126, 3: 247-254

Naeemi, E.D., Ahmad N., Al-Sharrah K.T., Behbahani M. 1995. Rapid and simple method for determination of cholesterol in processed food. *Journal of AOAC International*, 87, 6: 1522-1525

Navas P., Villalba J.M., Cabo R. 2007. The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses. *Mitochondrion*, 7, Suppl.1: S34-S40

- Nelson D.L., Cox M.M. 2005. Lehninger principles of biochemistry. 4<sup>th</sup> ed. New York, W. H. Freeman: 1119 str.
- Niklowitz P., Menke T., Andler W. Okun J.G. 2004. Simultaneous analysis of coenzyme Q10 in plasma, erythrocytes and platelets: comparison of the antioxidant level in blood cells and their environment in healthy children and after oral supplementation in adults. *Clinica Chimica Acta*, 342: 219-226
- Nohl H., Gille L., Kozlov A.V. 1998. Antioxidant-derived prooxidant formation from ubiquinol. *Free Radical Biology and Medicine*, 25: 666-675
- Palamakula A., Soliman M., Khan M.M. 2005. Regional permeability of coenzyme Q10 in isolated rat gastrointestinal tracts. *Pharmazie*, 60: 212-214
- Park, P. W., Goins R.E. 1994. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of Food Science*, 59: 1262–1266
- Phenomenex. 2006. Solid phase extraction products. Torrance, USA, Phenomenex <http://www.phenomenex.com/products/brands/> (maj 2008): 2 str.
- Prošek M., Šmidovnik A., Fir M., Stražišar M. 2004. TLC identification and quantification of coenzyme Q10-β-cyclodextrin complex. *Journal of Planar Chromatography*, 17: 181-185
- Quinzii C.M., Hirano M., DiMauro S. 2007. CoQ<sub>10</sub> deficiency diseases in adults. *Mitochondrion*, 7, Suppl.1: S122-S126
- Rötig A., Mollet J., Rio M., Munnich A. 2007. Infantile and pediatric quinone deficiency diseases. *Mitochondrion*, 7, Suppl.1: S112-S121
- Ruiz-Jimenez J., Priego-Capote F., Mata-Granados J.M., Quesada J.M., Luque de Castro M.D. 2007. Determination of the ubiquinol-10 and unquinone-10 (coenzyme Q10) in human serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry to evaluate the oxidative stress. *Journal of Chromatography A*, 1175: 242-248
- Rustin P., Munnich A., Rotig A. 2004. Mitochondrial respiratory chain dysfunction caused by coenzyme Q deficiency. *Methods in Enzymology*, 382: 81-88
- Santos-Ocana C., Do T.Q., Padilla S., Navas P., Clarke C.F. 2002. Uptake of exogenous coenzyme Q and transport to mitochondria is required for bc1 complex stability in yeast CoQ Mutants. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 10973-10981
- SAS Software. Version 8.01. 1999. Cary, SAS Institute Inc.: software
- Scriver C.R., Kaufman Eisensmith, R.C., Woo S.L.C. 1995. The hyperphenylalaninemias. V: The metabolic and molecular basis of inherited disease. Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D. (eds.). 7<sup>th</sup> ed. New York, McGraw Hill: 1015-1075
- Shinde S., Patil N., Tendolkar A. 2005. Coenzyme Q10: A Review of essential functions. *Internet Journal of Nutrition and Wellness*, 1, 2: 1-14
- Silica Company. 2008. Florisil® selective adsorbents. Berkeley Springs, Silica Company <http://www.u-s-silica.com/florisil.htm> (maj 2008): 3 str.
- Souchet N., Laplante S. 2007. Seasonal variation of co-enzyme Q10 content in pelagic fish tissues from Eastern Quebec. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 403-410

- Stadtman E.R., Levine R.L. 2000. Protein oxidation. Annals of the New York Academy of Sciences, 899: 191-208
- Stella V.J., Rajewski R.A. 1997. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. Pharmaceutical Research, 14: 556-567
- Stocker R., Bowry V.W., Frei B. 1991. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88, 5: 1646-1650
- Stražišar M., Fir M., Golc-Wondra A., Milivojević L. 2005. Quantitative determination of coenzyme Q10 by liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry in dairy products. Journal of AOAC International, 88, 4: 1020-1027
- Szejtli J. 1998. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. Chemical Reviews, 98: 1743-1753
- Terao K., Nakata D., Fukumi H., Schmid G., Arima H., Hirayama F., Uekama K. 2006. Enhancement of oral bioavailability of coenzyme Q<sub>10</sub> by complexation with  $\gamma$ -cyclodextrin in healthy adults. Nutrition Research, 26: 503-508
- Teshima K., Kondo T. 2005. Analytical method for ubiquinone-9 and ubiquinone-10 in rat tissues by liquid chromatography/turbo ion spray tandem mass spectrometry with 1-alkylamine as an additive to the mobile phase. Analytical Biochemistry, 338, 1: 12-19
- Turunen M., Swiezewska E., Chojnacki T. 2002. Regulatory aspects of coenzyme Q10 metabolism. Free Radical Biology and Medicine, 36: 437-443
- Ulbricht T.L.V., Southgate D.A.T. 1991. Coronary heart-disease – 7 dietary factors. Lancet, 338: 985-992
- Wang Q., Lee B.L., Ong C.N. 1999. Automated high-performance liquid chromatographic method with precolumn reduction for the determination of ubiquinol and ubiquinone in human plasma. Journal of Chromatography B, 726: 297-302
- Weber C., Bysted A., Holmer G. 1997. Coenzyme Q10 in the diet-daily intake and relative bioavailability. Molecular Aspects of Medicine, 18: 251-254
- Zhang Y., Appelkvist E.L., Kristensson K., Dallner G. 1996. The lipid compositions of different regions of rat brain during development and aging. Neurobiology of Aging, 17: 869-875

## ZAHVALA

Ob tej priložnosti bi se rada zahvalila mentorici doc. dr. Lei Gašperlin za strokovno pomoč pri oblikovanju diplomskega dela.

Zahvala gre somentorju dr. Tomažu Polaku za pomoč pri izvedbi praktičnega dela ter za koristne nasvete pri nastajanju diplomskega dela.

Hvala recenzentu doc. dr. Blažu Cigiću za skrben pregled diplomskega dela.

Zahvala gre tudi Maji Fir, Mirku Prošku in Andreju Šmidovniku s Kemijskega inštituta v Ljubljani za skupno sodelovanje pri projektu, katerega del je bilo tudi moje diplomsko delo.

Zahvaljujem se univ. dipl. ing. živil. tehnol. Ivici Hočevar za pregled diplomskega dela.

Polona, Jasmina in Ana, hvala za prijetno delovno vzdušje v laboratoriju.

Mama in ati, hvala, ker sta mi omogočila študij in mi vseskozi stala ob strani. Brez vaju danes ne bi postala to, kar sem.

Maja, hvala za marsikateri sestrski nasvet.

Tomaž, hvala, ker si verjel vame ter mi s številnimi vzpodbudnimi besedami olajšal nastajanje diplomskega dela.