

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2016

Е. И. Каленикова*, М. Г. Токарева, Е. А. Городецкая, А. А. Галеева,
Э. М. Кибизова, О. С. Медведев

БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОЭНЗИМА Q₁₀ (УБИДЕКАРЕНОНА)

МГУ им. М. В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, Россия, 119192, Москва, Ломоносовский пр-кт, 27/1; e-mail: * eikaleni@fbm.msu.ru

Представлен литературный обзор методов количественного определения коэнзима Q₁₀ в биоматериале, которые нашли наибольшее применение. Среди спектрофотометрических, электрохимических и хроматографических методов преимущество остается за ВЭЖХ в сочетании с ЭХ-детектированием благодаря высокой селективности, чувствительности и доступности современных детекторов.

Ключевые слова: убидекаренон; коэнзим Q₁₀; убихинон; убихинол; спектрофотометрический метод; электрохимический метод; ВЭЖХ.

Возрастающая частота заболеваний, вызванных нарушением метаболических процессов, определяет необходимость поиска лекарственных средств, способных корректировать метаболическую дисфункцию.

Одним из таких лекарственных средств является убидекаренон (коэнзим Q₁₀, CoQ₁₀, 2-[(2E,6E,10E,14E,18E,22E,26E,30E,34E)3,7,11,15,19,23,27,31,35,39-декаметилтетраокта-2,6,10,14,18,22,26,30,34,38-декаенил]-5,6-диметокси-3-метилциклогекса-2,5-диен-1,4-дион). По химической структуре CoQ₁₀ является производным бензохинона и содержит 10 групп изопрена в боковой цепи.

Липофильная боковая цепь в структуре CoQ₁₀ определяет его гидрофобные свойства. По этой причине CoQ₁₀ практически не растворим в воде, растворим в ацетоне, очень слабо растворим в этаноле [1]. CoQ₁₀ чувствителен к химическим воздействиям, так как бензохинонное кольцо легко окисляется.

В настоящей работе представлен литературный обзор аналитических подходов, которые нашли наиболее широкое применение в биофармацевтических исследованиях CoQ₁₀.

Пробоподготовка коэнзима Q₁₀

Пробоподготовка предшествует количественному анализу и проводится с целью отделения определяемого вещества от сопутствующих компонентов. Анализировать CoQ₁₀ в биоматериале достаточно сложно из-за высокой чувствительности вещества к физико-химическим воздействиям [2].

Для определения CoQ₁₀ в тканях требуется их тщательная гомогенизация; рекомендуемая масса гомогенизируемого образца составляет 0,5 – 1,0 г [3]. В связи с тем, что определяемое вещество чувствительно к свету, пробоподготовку рекомендуется проводить в затемненном помещении [4]. Некоторые авторы советуют проводить пробоподготовку при низкой температу-

ре (4 – 5 °С) для понижения скорости разложения коэнзима [5, 6]. Для получения требуемой консистенции гомогената используют различные растворители: воду [7], физиологический раствор [8] и растворители — экстрагенты, например пропанол-2 [3], смесь метанола и гексана [9]. Из-за высокой способности к окислению CoQ₁₀ образцы желательно защитить от воздействия кислорода. Для этой цели в раствор добавляют антиоксиданты, такие как 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол (ВНТ) или боргидрид натрия [9, 10].

Следующим этапом пробоподготовки является депротенинизация гомогената или биологических жидкостей (кровь, сыворотка, плазма), так как присутствующие в них белки оказывают негативное влияние на хроматографическую колонку. Для осаждения белков используют этанол, метанол, пропанол-2 и их смеси [11]. Этиловый спирт является наиболее часто используемым агентом для депротенинизации крови [10, 12, 13, 14, 15], а также гомогенатов различных тканей [5, 6, 7, 9, 16] вследствие доступности и низкой токсичности.

Следующим этапом после осаждения белков является отделение CoQ₁₀ от других компонентов матрицы. Для удаления этих веществ используют жидкостно-жидкостную экстракцию, а в качестве экстрагентов применяют пропанол, петролейный эфир, пропанол-2, гексан или их смеси с метанолом, этилацетатом, этанолом. Данные экстрагенты обеспечивают селективность солиubilизации аналита и высокую эффективность экстракции. К примеру, *n*-гексан использовали для экстрагирования CoQ₁₀ из плазмы крови [17, 18, 19]. Пропанол-2 применяли для выделения CoQ₁₀ из сыворотки крови крыс [20]. Смесь петролейный эфир — этилацетат — метанол (1:1:1) экстрагировали CoQ₁₀ из мультивитаминных БАД [21]. Для депротенинизации и извлечения CoQ₁₀ из плазмы крови реко-

мендуется *n*-пропанол [22]. В работе [23] проведена экстракция плазмы и гомогенатов тканей смесью этанола с *n*-гексаном (1:2:5) [24] с модификацией [25]. Процедуру экстракции проводили дважды, добавив *n*-гексан после отбора первой порции экстракта. Экстракты объединяли, упаривали досуха и растворяли в аликвоте этанола.

Окончательным этапом пробоподготовки является удаление остатков экстрагента. С этой целью в качестве сушильного агента применяют инертный газ [12, 26]. Процедуру проводят при комнатной температуре. Для большого количества экстракта используют выпаривание при низком давлении.

Методы количественного определения коэнзима

Q₁₀

Для количественного определения CoQ₁₀ используют физико-химические методы анализа. За счет наличия в структуре сопряженных двойных связей убидекаренон обладает характерным поглощением в УФ-спектре, аналитическая длина волны составляет 275 нм.

Спектрофотометрические методы

Методы спектрофотометрии (СФ) применяются преимущественно для оперативного определения CoQ₁₀ в фармацевтических препаратах [1]. Эти методы имеют преимущества: доступность, экспрессность, отсутствие необходимости в токсичных растворителях и низкая стоимость анализа. Селективность и чувствительность СФ-метода можно повысить за счет получения и анализа производных CoQ₁₀. Так, в работе [27] применен колориметрический метод определения CoQ₁₀ в моче человека после предварительной реакции нуклеофильного замещения метоксигрупп цианэтилацетатом. В результате реакции образуется соединение, окрашенное в голубой цвет. В дальнейшем данную реакцию применяли для определения CoQ₁₀ в крови человека [13].

Существенными недостатками СФ-методов являются небольшая чувствительность, низкая селективность и возможность для сопутствующих веществ оказывать влияние на аналитический сигнал.

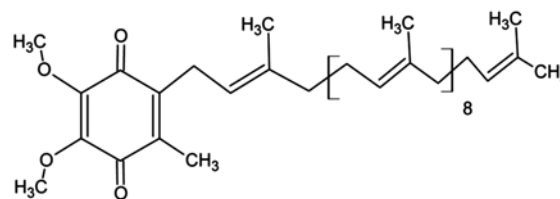
Электрохимические методы

За счет содержания в составе убихинона электрофильных групп возможно использование электрохимических методов анализа. В исследовании [28] применили полярографический метод для определения CoQ₁₀ в фармацевтических препаратах и биологически активных добавках.

Возможно применение вольтамперометрического метода количественного определения CoQ₁₀ в фармацевтических препаратах [29]. Отрицательными сторонами электрохимических методов являются использование токсичных растворителей и длительной трудоемкой пробоподготовки, в ходе которой возможно изменение соотношения убихинон — убихинола.

Метод ВЭЖХ

Однако наибольшее распространение приобрел метод ВЭЖХ в сочетании с различными детекторами.



Структурная формула CoQ₁₀ в соответствии с European pharmacopoeia 2005, version 5.2; C₅₉H₉₀O₄; молек. масса 863,34.

ВЭЖХ с электрохимическим [30], спектрофотометрическим [31] и масс-спектрометрическим детектированием [32] является наиболее распространенным методом количественного анализа CoQ₁₀ в биологических образцах. Флуоресцентные детекторы, имеющие высокую селективность и чувствительность, также используются в анализе биологических образцов. Так как у CoQ₁₀ нет флуоресцентных свойств, то для проведения анализа в молекулу вводят флуорофорные группы [33].

Для определения убидекаренона рекомендуется использовать обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ [34]. Данный метод имеет ряд достоинств в сравнении с нормально-фазовым вариантом — лучшую воспроизводимость и большую селективность.

ВЭЖХ со спектрофотометрическим и электрохимическим детектированием

В Европейской фармакопее, издание 7, изложен метод ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием при λ = 275 нм. Для анализа использовали обращенно-фазовый вариант, подвижную фазу этанол — метанол в соотношении 20:80 [1]. В работе [35] разработана ВЭЖХ-методика в обращенно-фазовом варианте определения CoQ₁₀ в биологических объектах: моче, тканях органов и плазме. При проведении анализа использовали внутренний стандарт — раствор CoQ₁₀ в гексане. Смесью метанола с гексаном (3:1) являлась подвижной фазой. Сигнал убихинона детектировался при длине волны 275 нм. Предел обнаружения составил 10 нг/мл. В исследовании [12] разработали метод совместного определения α-токоферола, CoQ₁₀ и ретинола в плазме человека. Подвижная фаза состояла из смеси метанола с гексаном в соотношении 70:30. Детектирование осуществляли при длине волны 276 нм. Предел обнаружения убихинона составил 0,83 мкмоль/л.

В работе [23] описана методика ВЭЖХ с электрохимическим детектированием. Анализ проводили, используя кулонометрический детектор “Coulchem II” с ячейкой модели 5011 (ESA, USA), колонка Phenomenex, Luna C18, 150 × 4,6 мм, 5 μм. В состав подвижной фазы входил 0,3 % NaCl (в/о) в смеси этанол — метанол — 7 % HClO₄ в соотношении 975:15:10 соответственно. Предварительно перед внесением на колонку окисленную форму переводили в восстановленную с помощью добавления спиртового раствора тетрагидробората натрия в экстракт плазмы. Детектирование убихинола проводили в окислитель-

ном режиме при напряжениях – 50 мВ/+ 350 мВ на первом и втором электродах соответственно.

Сравнительную характеристику электрохимического и спектрофотометрического детектирования в анализе коэнзима в плазме провели в работе [36]. Для уменьшения влияния мешающих компонентов матрицы в пробе предварительно проводили очистку на картридже из силикагеля (Bond Elut Si). Затем элюат направляли в картридж Bond Elut C18, элюировали 2-пропанолом и проводили анализ с помощью обращено-фазовой колонки Ultrasphere XL C18 (4,6 × 70 мм). Для спектрофотометрического детектирования использовали элюент метанол – 2-пропанол (4:1), а для электрохимического в качестве элюента брали смесь 50 мМ ацетатного буфера – 2-пропанола – метанола (24:450:1435). Предел обнаружения составил 50 нг/мл для спектрофотометрического и 5 нг/мл для электрохимического детектора. В большей части работ фоновым электролитом служил перхлорат лития. Авторы исследования [37] в качестве наилучшего фонового электролита выбрали формиат аммония, так как использование перхлората лития приводит к уменьшению срока службы прибора из-за высокой коррозирующей способности перхлоратов. Авторы исследования [38] проводили количественное определение CoQ₁₀ в моче с помощью ВЭЖХ с электрохимическим детектированием. В работе использовали кулонометрический детектор “Coulchem II” с ячейкой модели 5010 (ESA, USA), колонку Nucleosil 100 C-18 (250 × 4 мм; 5 мкм). Подвижная фаза состояла из перхлората лития в смеси метанола и этанола в соотношении 65:35. Детектирование проводили при напряжении – 600 мВ и + 600 мВ.

ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием

Достоинствами метода является высокая чувствительность, высокая селективность и достоверность, позволяющая определять CoQ₁₀ в материале со сложным составом. Кроме того, метод позволяет определять окисленную и восстановленную форму коэнзима, используя простую процедуру пробоподготовки. При анализе CoQ₁₀ в различных биологических объектах данные преимущества существенны. Работа [39] посвящена определению CoQ₁₀ методом ВЭЖХ с использованием различных детекторов: электрохимического и масс-спектрометрического, оснащенного ионной ловушкой. В качестве источника ионизирующего излучения использовали электроспрей и химическую ионизацию при атмосферном давлении. В работе представлены данные исследования влияния различных вариантов ионизации на регистрацию отрицательных и положительных ионов. Наилучшие результаты были получены при регистрации отрицательных ионов. Предел обнаружения составил 1 нг/мл. С использованием метода ультра-ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией разработан способ определения окисленной и восстановленной формы CoQ₁₀ в плазме крови человека. Определение осуществляли методом масс-спектрометрии с ионизацией электро-

распылением в режиме регистрации положительных ионов. Предел обнаружения окисленной и восстановленной формы составил 10 и 5 нг/мл соответственно [40]. Таким образом, если для целей фармацевтического анализа CoQ₁₀ наиболее популярен и востребован спектрофотометрический метод, то сложность матрицы биообразцов определяет выбор в пользу более селективных и чувствительных методов: ВЭЖХ в сочетании со спектрофотометрическим, электрохимическим и МС-детекторами. При этом спектрофотометрические детекторы не всегда обладают достаточной селективностью и чувствительностью. Метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием, несмотря на очевидные преимущества, все еще не получил широкого применения из-за высокой стоимости оборудования. Отрицательными сторонами электрохимических методов детекции являются использование токсичных растворителей и трудоемкой пробоподготовки, в ходе которой возможно изменение соотношения убихинон — убихинол. Тем не менее ВЭЖХ с использованием электрохимического детектора является на сегодня оптимальным выбором для биофармацевтического анализа CoQ₁₀ благодаря сочетанию высокой селективности, чувствительности и доступности современных детекторов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-15-00126).

ЛИТЕРАТУРА

1. *European pharmacopoeia 7.0*, Vol. 2, Council of Europe, Strasbourg (2011).
2. H. W. Moore and K. Folkers, *J. Am. Chem. Soc.*, No. 87, 1409 – 1410 (1965).
3. H. Kubo, K. Fujii, T. Kawabe, et al., *J. Food Compost. Anal.*, **21**(31), 199 – 210 (2008).
4. Q. Wang, B. L. Lee, C. N. Ong, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **726**(1 – 2), 297 – 302 (1999).
5. H. Wakabayashi, S. Yamato, M. Nakajima, et al., *Biol. Pharm. Bul.*, **17**(10), 997 – 1002 (1994).
6. S. Ikenoya, M. Takada, T. Yuzuriha, et al., *Chem. Pharm. Bul.*, **29**(1), 158 – 164 (1981).
7. K. Teshima, T. Kondo, *Anal. Biochem.*, **338**(1), 12 – 19 (2005).
8. Y. Yoshida, M. Hayakawa, Y. Habuchi, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**(10), 1558 – 1568 (2006).
9. C. Leray, M. D. Andriampandry, M. Freund, et al., *J. Lipid Res.*, **39**(10), 2099 – 2105 (1998).
10. B. Finckh, A. Kontush, M. Burdelski, et al., *Anal. Biochem.*, **232**(2), 210 – 216 (1995).
11. M. J. Turkowicz, J. Karpinska, *Biofactors*, **39**(2), 176 – 185 (2013).
12. J. Karpinska, B. Mikoluc, R. Motkowski, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **42**(2), 232 – 236 (2006).
13. T. A. Laguna, M. K. Sontag, I. Osberg, et al., *J. Pediatr.*, **153**(3), 402 – 407 (2008).
14. B. L. Lee, C. N. Ong, *J. Chromatogr. A*, **1216**(15), 3131 – 3137 (2009).
15. M. Morita, K. Folkers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**(3), 950 – 954 (1993).
16. K. Katayama, M. Takada, T. Yuzuriha, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**(3), 971 – 977 (1980).
17. J. Ruiz-Jimenez, F. Priego-Capote, J. M. Mata-Granados, et al., *J. Chromatogr. A*, **1175**(2), 242 – 248 (2007).
18. L. Li, D. Pabbisetty, S. Zhu, et al., *J. Chromatogr. Sci.*, **46**(3), 215 – 219 (2008).

19. C. Weber, A. Bysted, G. Holmer, *Mol. Aspects. Med.*, No. 18, 251 – 254 (1997).
20. L. Li, D. Pabbisetty, P. Carvalho, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **46**(1), 137 – 142 (2008).
21. D. E. Breithaupt, S. Kraut, *Eur. Food Res. Technol.*, 643 – 649 (2006).
22. F. Mosca, D. Fattorini, S. Bompadre, et al., *Anal. Biochem.*, **305**(1), 49 – 54 (2002).
23. Е. И. Каленикова, Е. В. Харитоновна, Е. А. Городецкая и др., *Биомед. химия*, **61**(1), 125 – 131 (2015).
24. A. Lassa, R.S. Sohal, *Free Radic. Biol. Med.*, **27**(1–2), 220 – 226 (1999).
25. E. I. Kalenikova, E. A. Gorodetskaya, E. G. Kolokolchikova, et al., *Biochemistry (Mosc)*, **72**(3), 332 – 338 (2007).
26. R. Rodriguez-Acuna, E. Brenne, F. Lacoste, *J. Agric. Food Chem.*, **56**(15), 6241 – 6245 (2008).
27. F. R. Koniuszy, P. H. Gale, A. C. Page, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, No. 87, 298 – 305 (1960).
28. H. Y. Yang, J. F. Song, *Anal. Biochem.*, **348**(1), 69 – 74 (2006).
29. S. Michalkiewicz, *Bioelectrochemistry*, **73**(1), 30 – 36 (2008).
30. P. Niklowitz, F. Doring, M. Paulussen, et al., *Anal. Biochem.*, **437**(1), 88 – 94 (2013).
31. D. Orozco, J. Skamarack, K. Reins, et al., *J. AOAC Int.*, **90**(5), 1227 – 1236 (2007).
32. Z. Tang, S. Li, X. Guan, et al., *Analyst*, **139**(21), 5600 – 5604 (2014).
33. Y. Nohara, J. Suzuki, H. Kubo, *J. Fluoresc.*, **21**(6), 2093 – 2100 (2011).
34. R. Pauls, *J. Chromatogr. Sci.*, **23**(4), 181 – 184 (1985).
35. T. Okamoto, K. Fukui, *J. Chromatogr.*, **342**(1), 35 – 46 (1985).
36. R. A. Hagerman, R. A. Willis, A. E. Hagerman, *Anal. Biochem.*, **320**(1), 125 – 128 (2003).
37. C. Morisco, B. Trimarco, M. Condorelli, *Clin. Investig.*, **71**(8), 134 – 136 (1993).
38. D. Yubero, R. Montero, M. Ramos, et al., *Biofactors*, **41**(6), 424 – 430 (2015).
39. Y. Zu, C. Zhao, C. Li, et al., *J. Sep. Sci.*, **29**(11), 1607 – 1612 (2006).
40. A. J. Claessens, C. K. Yeung, L. J. Risler, et al., *Ann. Clin. Biochem.*, **53**(2), 265 – 273 (2016).

Поступила 30.09.16

BIOPHARMACEUTICAL ANALYSIS OF COENZYME Q10 (UBIDECARENONE)

E. I. Kalenikova*, M. G. Tokareva, E. A. Gorodetskaya, A. A. Galeeva,
E. M. Kibizova, and O. S. Medvedev

Department of Medicine, Moscow State University, Moscow, 119192 Russia

* e-mail: eikaleni@fbm.msu.ru

A literature review of methods most frequently used for the quantitative determination of coenzyme Q10 (ubidecarenone) in biomaterials is presented. HPLC in combination with electrochemical (EC) detection is advantageous to other spectrophotometric, electrochemical, and chromatographic methods due to the high selectivity and sensitivity and the availability of modern high-quality EC detectors.

Keywords: ubidecarenone; coenzyme Q10; ubiquinone; ubiquinol; spectrophotometric method; electrochemical method; HPLC.