© Коллектив авторов, 2016

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

БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОЭНЗИМА Q_{10} (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 Q_{10} 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 Q_{10}; 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 Q_{10}, CoQ_{10}, 2-[(2E,6E,10E,14E,18E,22E,26E,30E,34E)-3,7,11,15,19,23,27,31,35,39- декаметилтетраконта-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 CoQ_{10} является производным бензохинона и содержит 10 групп изопрена в боковой цепи.

Липофильная боковая цепь в структуре CoQ_{10} определяет его гидрофобные свойства. По этой причине CoQ_{10} практически не растворим в воде, растворим в ацетоне, очень слабо растворим в этаноле [1]. CoQ_{10} 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 CoQ_{10}.

Пробоподготовка коэнзима Q_{10}

Пробоподготовка предшествует количественному анализу и проводится с целью отделения определяемого вещества от сопутствующих компонентов. Анализировать CoQ_{10} в биоматериале достаточно сложно из-за высокой чувствительности вещества к физико-химическим воздействиям [2].

Для определения CoQ_{10} 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 температуре (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 CoQ_{10} образцы желательно защитить от воздействия кислорода. Для этой цели в раствор добавляют антиоксиданты, такие как 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол (BHT) или боргидрид натрия [9, 10].

Следующим этапом пробоподготовки является депротеинизация 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 так же гомогенатов различных тканей [5, 6, 7, 9, 17] вследствие доступности и низкой токсичности.

Следующим этапом после осаждения белков является отделение CoQ_{10} 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, этиалацетатом, этанолом. Данные экстрагенты обеспечивают селективность солюбилизации аналита и высокую эффективность экстракции. К примеру, n-гексан использовали для экстрагирования CoQ_{10} из плазмы крови [16, 18, 19]. Пропанол-2 применяли для выделения CoQ_{10} из сыворотки крови крыс [20]. Смесью петролейный эфир — этилацетат — метанол (1:1:1) экстрагировали CoQ_{10} из мультивитаминных БАД [21]. Для депротеинизации и извлечения CoQ_{10} из плазмы крови рекомендуется 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 темпера-

туре. Для большого количества экстракта используют выпаривание при низком давлении.

Методы количественного определения коэнзима Q_{10}

Для количественного определения CoQ_{10} 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 CoQ_{10} 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 CoQ_{10}. Так, в работе [27] применен колориметрический метод определения CoQ_{10} 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 CoQ_{10} в крови человека [13].

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

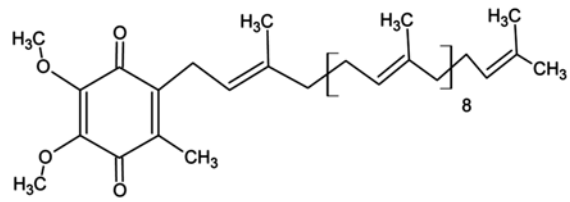
Электрохимические методы

За счет содержания в составе убихинона электрофильных групп возможно использование электрохимических методов анализа. В исследовании [28] применили полярографический метод для определения CoQ_{10} в фармацевтических препаратах и биологически активных добавках.

Возможно применение вольтамперометрического метода количественного определения CoQ_{10} 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. ВЭЖХ с электрохимическим [30], спектрофотометрическим [31] и масс-спектрометрическим детектированием [32] является наиболее распространенным методом количественного анализа CoQ_{10} в биологических образцах. Флуоресцентные детекторы, имеющие высокую селективность и чувствительность, также используются в анализе биологических образцов. Так как у CoQ_{10} нет флуоресцентных свойств, то для проведения анализа в молекулу вводят флуорофорные группы [33].



Структурная формула CoQ_{10} в соответствии с European pharmacopoeia 2005, version 5.2; $C_{59}H_{90}O_4$; молек. масса 863,34.

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 $\lambda = 275$ 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 CoQ_{10} в биологических объектах: моче, тканях органов и плазме. При проведении анализа использовали внутренний стандарт — раствор CoQ_{10} в гексане. Смесь 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, CoQ_{10} 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 “Coulochem 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 % $HClO_4$ 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 окислительном 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 Cl8, элюировали 2-пропанолом и проводили анализ с помощью обра-

щено-фазовой колонки Ultrasphere XL Cl8 (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 CoQ_{10} в моче с помощью ВЭЖХ с электрохимическим детектированием. В работе использовали кулонометрический детектор "Coulochem II" с ячейкой модели 5010 (ESA, USA), колонку Nucleosil 100 C-18 (250 мм 3 4 мм; 5 мм). 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 CoQ_{10} в материале со сложным составом. Кроме того, метод позволяет определять окисленную и восстановленную форму коэнзима, используя простую процедуру пробоподготовки. При анализе CoQ_{10} в различных биологических объектах данные преимущества существенны. Работа [39] посвящена определению CoQ_{10} 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-ВЭЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией разработан способ определения окисленной и восстановленной формы CoQ_{10} в плазме крови человека. Определение осуществляли методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением 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 CoQ_{10} 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 CoQ_{10} 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. Bull.*, **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. Andriamampandry, 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. J. Ruiz-Jimenez, F. Priego-Capote, J. M. Mata-Granados, et al., *J. Chromatogr. A*, **1175**(2), 242 – 248 (2007).
17. K. Katayama, M. Takada, T. Yuzuriha, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**(3), 971 – 977 (1980).
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. Харитонова, Е. А. Городецкая и др., *Биомедицинская химия*, **61**(1), 125 – 131 (2015).
24. A. Lass, 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 Q_{10} (ubidecarenone)

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

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Medicine

Lomonosovsky pr. 27/1 Moscow 119192

* eikaleni@fbm.msu.ru

Summary

The literature review of frequently used methods for the quantitative determination of coenzyme Q_{10} in the biomaterial is presented. HPLC with EC detection has the advantage among spectrophotometric, electrochemical and chromatographic methods due to the high selectivity, sensitivity and availability of modern detectors.

Key words: ubidecarenone; coenzyme Q_{10}; ubiquinone; ubiquinol; spectrophotometric method; electrochemical method; HPLC.