

Coenzym Q10 – Analyse eines Sensibelchens

Analyse von instabilen Verbindungen mittels online-SFE-SFC

Dr. Isabelle Möller

Shimadzu Deutschland GmbH

Freie Radikale, also kurzlebige Molekülfragmente aus Sauerstoff, stehen im Verdacht, für Alterungsprozesse verantwortlich zu sein, aber auch für Schäden an Zellen oder Enzymen. Die Zellen verfügen jedoch über eigene Abwehrmechanismen, um gegen freie Radikale vorzugehen. Solche Antioxidantien, die mit freien Radikalen reagieren, werden unter anderem durch die Nahrung aufgenommen, etwa Ascorbinsäure oder Coenzym Q10, ein Vitaminverwandter.

UV-Strahlung, Schadstoffe in der Luft oder Chemikalien führen im menschlichen Körper vermehrt zur Bildung hochreaktiver Sauerstoffverbindungen, sogenannte freie Radikale. Treten sie gehäuft auf, können sie für Zellschäden sorgen und andere Alterungserscheinungen, wie zum Beispiel Faltenbildung. Sogar mit der Entstehung einer Reihe von Krankheiten werden freie Radikale in Verbindung gebracht – von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bis zur Krebserkrankung.

Neben den oben genannten körpereigenen Antioxidantien können auch über die Nahrung aufgenommene Substanzen eine ähnliche Wirkung aufweisen. Bekanntestes Beispiel dafür sind sicherlich Vitamine oder deren Vorstufen. Auch das Coenzym Q10 und dessen reduzierte Form, die strukturell mit den Vitaminen E und K verwandt ist, gehören dazu.

Neben seiner Eigenschaft als Antioxidans ist es durch seine einfache Oxidierbarkeit auch an wichtigen biochemischen Prozessen beteiligt, wie der Zellatmung. Wie kann man also eine so empfindliche und einfach umzuwandelnde Substanz sicher analysieren?

Superkritische Fluide zur schonenden Extraktion

Für oxidationsempfindliche Substanzen bietet die Analyse mittels überkritischen Kohlendioxids eine schonende Alternative zur klassischen Lösungsmittelextraktion. Überkritische Fluide vereinigen die Charakteristika von Gasen und Flüssigkeiten: Sie haben eine niedrige Viskosität und diffundieren leicht – ähnlich

den Gasen, sind aber auch gut löslich – ähnlich den Flüssigkeiten. Unter diesen Fluiden wird CO₂ am häufigsten für chromatographische Zwecke verwendet, da es neben seiner geeigneten physikochemischen Eigenschaften und einfachen Verfügbarkeit sehr inert, nicht toxisch und kostengünstig ist.

Bisher konnten Techniken wie die SFC (supercritical fluid chromatography) und SFE (supercritical fluid extraction) jedoch nur als einzelne Schritte einer Analyse eingesetzt werden. Die Geräte der neusten Generation vereinigen nun die komplette Analyse von der Probenvorbereitung über die chromatographische Trennung bis hin zur Detektion in einem Gerät.

Durch die online-Kopplung von SFE und SFC werden manuelle Extraktions- und Überführungsschritte durch einen vollautomatisierten Prozess ersetzt. Dadurch verringert sich nicht nur der Zeit und Personalaufwand, auch manuelle Fehler werden vermieden, die zum Beispiel beim Umfüllen oder Pipettieren auftreten können.

Ein zusätzlicher Vorteil des abgeschlossenen Systems der online-SFE-SFC ist die schonende Probenhandhabung. Nach dem Einstellen in das Gerät können Proben nahezu ohne Zersetzung analysiert werden, da der gesamte Prozess der Analyse unter Lichtausschluss, ohne Luftoxidation und unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit abläuft. Daher ist das System ideal für die Untersuchung empfindlicher Proben geeignet, wie zum Beispiel lichtempfindliche, einfach zu oxidierende oder hydrolyisierende Substanzen.

Online-SFE-SFC-Analyse von reduziertem Coenzym Q10

Auch für das empfindliche Coenzym Q10 (Abbildung 1) ist die online-SFE-SFC-Analyse eine sanfte Alternative zur klassischen Lösungsmittelextraktion.

Um einen direkten Vergleich der beiden Techniken zu erhalten, wurde der Anteil an reduziertem und oxidiertem Coenzym Q10 in einem Nahrungsergänzungsmittel mit beiden Techniken bestimmt. Die Analysen wurden mit einer Nexera UC von Shimadzu (Kyoto, Japan) durchgeführt, einem modularen Allround-SFE-SFC-System für leistungsintensive Hochgeschwindigkeits-Applikationen.

Für die Lösungsmittelextraktion wird der Inhalt einer Kapsel des Nahrungsergänzungsmittels in Ethanol suspendiert und das Coenzym Q10 im Ultraschallbad extrahiert. Nach einer Filtration wird die Probe mittels SFC unter den in Tabelle 1 angegebenen Bedingungen analysiert.

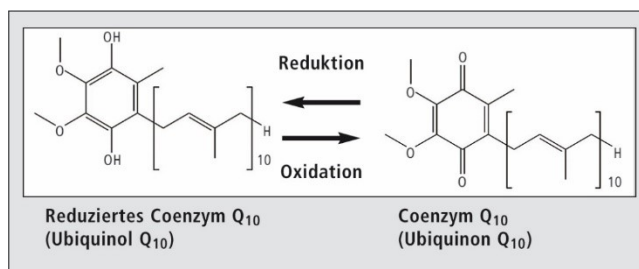


Abb. 1: Oxidierte und reduzierte Form des Coenzym Q10

| System | Nexera UC SFC-UV System |
|-------------------|---|
| Säule | Shim-pack UC-RP (150 mm L. x 4,6 mm I.D., 3 µm) |
| Säulentemperatur | 40 °C |
| Mobile Phase | A: CO ₂ B: MeOH |
| Flussrate | 3 ml/min |
| Zeitprogramm | 5 % B (0 min) → 50 % B (5 - 8 min) |
| Rückdruck | 10 MPa |
| Detektor | UV/Vis @ 220 nm |
| Injektionsvolumen | 1 µl |

Tab. 1: Analytische Bedingungen für SFC nach Lösungsmittel-extraktion

Für die online-SFE-SFC-Analyse werden etwa 5 µl des Inhalts der Kapsel auf ein Filterpapier getropft und direkt in ein Extraktionsgefäß gegeben. Anschließend verläuft die automatisierte Analyse unter den in Tabelle 2 angegebenen Bedingungen. Dabei folgt auf einen statischen Extraktionsschritt eine dynamische Extraktion, um die Probe auf die Säule zu überführen, wo dann die eigentliche chromatographische Trennung stattfindet. Ein Flussdiagramm des Prozesses ist in Abbildung 2 dargestellt.

Zusammenfassung

Die beiden Chromatogramme, jeweils auch mit einer Standardlösung der oxidierten Form zum Vergleich, sind in Abbildung 3 und 4 dargestellt.

Es ist klar zu erkennen, dass nach der Lösungsmittelextraktion nahezu das komplette Coenzym Q10 in seiner oxidierten Form vorliegt, wohingegen bei der Analyse mittels online-SFE-SFC nur ein sehr geringer Anteil der Analyten oxidiert wurde und größtenteils noch in seiner ursprünglichen reduzierten Form vorliegt.

Die online-SFE-SFC ist also sehr gut geeignet, um empfindliche Verbindungen wie oxidationsempfindliche Substanzen, zu analysieren. Nebenbei vermeidet die Nexera UC durch den großen Automatisierungsanteil Fehler und vereinfacht das Probenhandling.

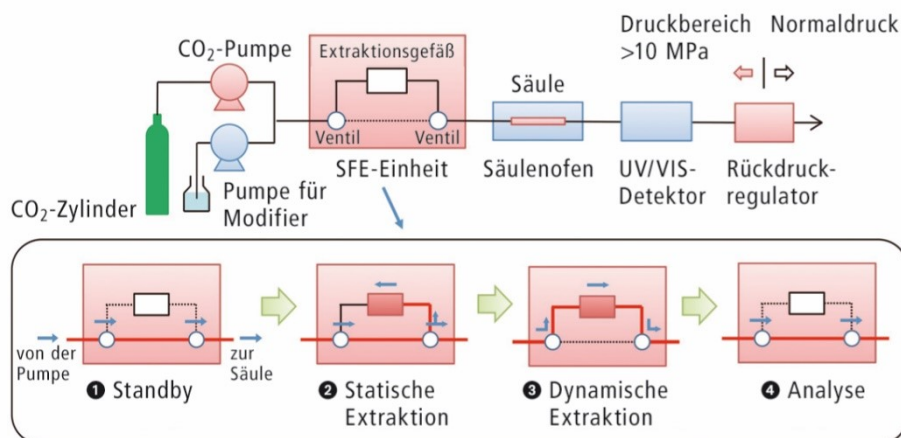


Abb. 2: Flussdiagramm der automatisierten online-SFE-SFC-Analyse

| System | Nexera UC SFE-SFC-UV System |
|-----------------------|---|
| SFE | |
| Extraktionsvolumen | 0,2 ml |
| Statische Extraktion | Zeit: 0 - 2 min |
| | Konz. B: 5 % |
| | Rückdruck: 10 MPa |
| | Flussrate: 3 ml/min |
| Dynamische Extraktion | Zeit: 2 - 4 min |
| | Konz. B: 5 % |
| | Rückdruck: 10 MPa |
| | Flussrate: 3 ml/min |
| SFC | |
| Säule | Shim-pack UC-RP (150 mm L. x 4,6 mm I.D., 3 µm) |
| Säulentemperatur | 40 °C |
| Mobile Phase | A: CO ₂ B: MeOH |
| Flussrate | 3 ml/min |
| Zeitprogramm | 5 % B (4 min) → 50 % B (9 - 13 min) |
| Rückdruck | 10 MPa |
| Detektor | UV/Vis @ 220 nm |

Tab. 2: Analytische Bedingungen für die Analyse mittels online-SFE-SFC

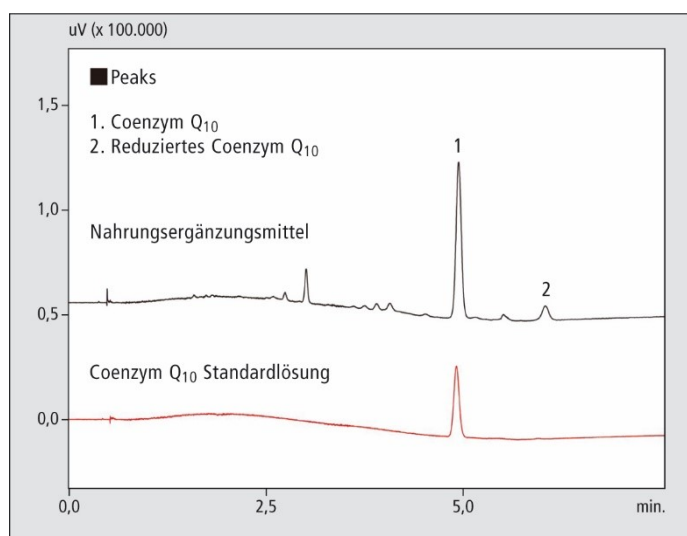


Abb. 3: SFC-Chromatogramm von Coenzym Q10 nach einer Lösungsmittelextraktion

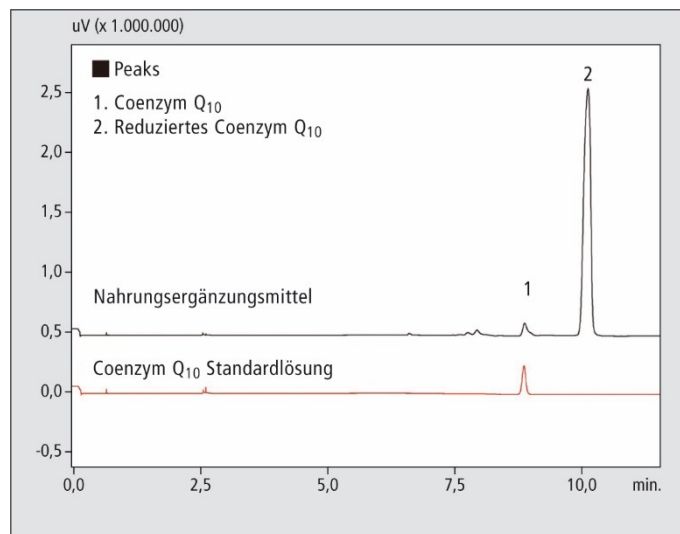


Abb. 4: SFC-Chromatogramm von Coenzym Q10 nach online-SFE-SFC