

仪器装置与实验技术

血浆辅酶 Q₁₀ 的高效液相色谱快速测定

江 平^{1,2}, 何代平¹, 许国旺²

(1. 西华师范大学 化学化工学院, 四川 南充 637002; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘 要: 建立了一种简单快速测定血浆辅酶 Q₁₀ (CoQ₁₀) 的反相高效液相色谱方法。血浆经正丙醇萃取, 上层清液直接进样分析。色谱柱为 Hypersil ODS₂ 5 μm, 150 mm × 4.6 mm i. d., 以异丙醇 - 甲醇 (体积比 1 : 9) 作流动相, 275 nm 作检测波长, 外标法定量。在 0.05 ~ 20 mg/L 范围内, 峰高与质量浓度呈良好的线性关系 ($r = 0.9998$), 血浆中辅酶 Q₁₀ 的检出限为 0.03 mg/L ($S/N = 3$)。该方法简单、快速、精密度高 ($RSD < 5\%$), 适宜于血浆辅酶 Q₁₀ 含量的检测。

关键词: 血浆; 辅酶 Q₁₀; 高效液相色谱

中图分类号: O657.72; Q551; Q592.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2006)02 - 0106 - 03

Rapid Determination of Coenzyme Q₁₀ in Human Plasma by High Performance Liquid Chromatography

JANG Ping^{1,2}, HE Dai-ping¹, XU Guo-wang²

(1. Department of Chemistry, China West Normal University, Nanchong 637002, China; 2. Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Dalian 116011, China)

Abstract: A simple and rapid high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the determination of coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) in human plasma was developed. CoQ₁₀ can be dissociated from lipoproteins and completely extracted into *n*-propanol. After centrifugation, the supernatant was filtrated and analyzed by HPLC. Hypersil ODS₂ 5 μm (150 mm × 4.6 mm i. d.) was selected as the analytical column, isopropanol - methanol (1 : 9 by volume) as the mobile phase with flow-rate of 1.5 mL/min, and UV 275 nm as the detection wavelength. The level of CoQ₁₀ was quantitatively determined by an external standard method. The linear range of the calibration curve of concentration vs peak height is 0.05 - 20 mg/L with a correlation coefficient of 0.9997. The detection limit of CoQ₁₀ in plasma was 0.03 mg/L ($S/N = 3$). This method is suitable for the determination of CoQ₁₀ in human plasma.

Key words: Plasma; Coenzyme Q₁₀; HPLC

辅酶 Q₁₀ (CoQ₁₀) 是一种脂溶性的类维生素物质, 广泛存在于动物、植物、微生物的细胞内并与线粒体内膜相结合。CoQ₁₀ 的生物活性主要来自其醌环的氧化还原特性及其侧链的理化性质 (结构见图 1)。CoQ₁₀ 是细胞代谢和细胞呼吸的激活剂, 具有天然的抗氧化活性, 能保持膜质流动性并增强人体非特异性免疫功能^[1-2]。研究表明, 细胞组织缺氧或肌体代谢过旺都会引起体内 CoQ₁₀ 的消耗, 此外, HMG - CoA 还原酶在抑制胆固醇合成的同时也阻碍了体内 CoQ₁₀ 的生物合成^[2]。因此, 检测 CoQ₁₀ 的含量具有重要的生物学意义。

对 CoQ₁₀ 的含量检测已有很多报道: 光度法^[3-4]、色谱法^[1,2,5-9]、伏安法^[10]、化学发光法^[11]、荧光法^[12]、电子磁共振法^[13]等, 其中最常用的还是液相色谱法。CoQ₁₀ 和脂质结合在一起, 文献 [9] 报道了其在各类脂质中的分布: 低密度脂蛋白中占 60%, 高密度脂蛋白中占 25%, 其他脂蛋白中占 15%。因此, 测定前定

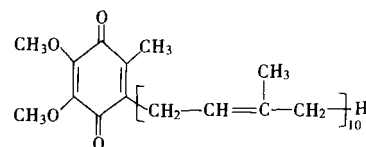


图 1 CoQ₁₀ 的结构
Fig. 1 Structure of CoQ₁₀

收稿日期: 2005 - 03 - 07; 修回日期: 2005 - 06 - 21

基金项目: 国家科技部国家高技术研究发展计划 (2003AA223061); 中国科学院知识创新工程领域前沿课题

作者简介: 江 平 (1976 -), 女, 四川绵阳人, 硕士, Tel: 0817 - 2568288, E-mail: jphdp868@sohu.com

量地萃取 CoQ₁₀成为整个分析过程的关键。很多文献 [1 - 3, 5 - 8]采用亲水性的有机溶剂 (比如乙醇或甲醇)去除血浆脂蛋白, 然后再用强疏水性的有机溶剂进行萃取。该过程常常需要多次反复操作以保证 CoQ₁₀完全进入疏水相, 因此操作较为繁琐, 且需大量有机溶剂。此外, 用这种提取方法作定量分析时, 需用大量氮气吹扫后定容, 成本较高, 人为操作误差也较大。本文采用一种简单的前处理方法, 只需一种溶剂便可实现脱脂和萃取两种功效, 该方法应用于血浆 CoQ₁₀的检测, 简单快速, 回收率高, 精密度较好。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Shimadzu液相色谱系统 (日本岛津公司), 配有 LC-10ATvp泵、SPD-10Avp检测器、SL-10ADvp型自动进样器、SCL-10Avp系统控制器和 Shimadzu CLass-VP色谱工作站; 色谱柱 ODS₂ (4.6 mm i. d. × 150 mm, 5 μm, 大连依利特公司); 有机系针筒式微孔滤膜 (0.22 μm, 大连依利特公司); 超速低温离心机 (美国科俊仪器公司)。

CoQ₁₀标准品 (Sigma公司), 甲醇、正丙醇、异丙醇均为色谱纯 (北京天地公司)。所有血样由大连市中心医院提供。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制 称取约 10 mg CoQ₁₀标准品, 加入无水乙醇溶解并定容至 25 mL, 由 275 nm 处的吸光值 (摩尔吸光系数 $\epsilon = 14\ 600$)测定其准确浓度, 然后将该溶液稀释成 100 mg/L的储备液, 在避光条件下于冰箱中冷冻保存。

1.2.2 血样的收集 将新鲜血液注入以肝素作抗凝剂的试管中, 立即在 2 500 r/min下离心 10 min, 取上层血浆, 迅速放入冰箱 (-20 °C)中保存。分析时, 将冰冻血浆置于室温下解冻 2 h后, 进行血浆的预处理。

1.2.3 血浆的预处理 因 CoQ₁₀结构中含有异戊烯基, 见光易降解, 故样品的预处理均在避光条件下进行。取 0.3 mL血浆于离心管中, 加入 1 mL正丙醇, 振荡 5 min, 在 8 000 r/min下离心 10 min, 取上层清液, 经微孔式针筒过滤器过滤后进行色谱分析。

1.2.4 色谱条件 采用 ODS₂色谱柱 (4.6 mm i. d. ×150 mm, 5 μm), 流动相为异丙醇 - 甲醇 (体积比 1 : 9); 流速: 1.5 mL/min; 检测波长: 275 nm; 进样量: 400 μL。

2 结果与讨论

2.1 萃取溶剂的选择

CoQ₁₀和血浆中的脂蛋白结合在一起, 因此, 往往需要先经亲水性的溶剂脱脂蛋白, 然后采用疏水性的溶剂对 CoQ₁₀进行萃取。本文比较了几种常见的有机溶剂, 发现正丙醇既能脱脂又能定量萃取 CoQ₁₀, 大大简化了 CoQ₁₀的提取过程。己烷、甲醇、乙腈和三氯乙酸因其极性太弱或太强, 均不能将 CoQ₁₀从血浆中提取出来, 其回收率为零。其它几种常见有机溶剂的萃取回收率见表 1。

表 1 各种有机溶剂的萃取回收率

Table 1 Extraction recovery using different solvents

Solvent	Volume of plasma V/mL	Volume of solvent V/mL	Recovery ($\bar{R} \pm SD$) /%	n
Ethanol(乙醇)	0.3	1	31	1
Acetone(丙酮)	0.3	1	88	1
i-Propanol(异丙醇)	0.3	1	108.3 ±14.4	3
n-Propanol(正丙醇)	0.2	1	96 ±9.2	3
n-Propanol(正丙醇)	0.3	1	98 ±3.5	3
n-Propanol(正丙醇)	0.4	1	95.3 ±4.0	3
n-Propanol(正丙醇)	0.5	1	90.7 ±10.7	3

2.2 血浆与正丙醇用量的最佳体积比

血浆 CoQ₁₀ 的浓度较低，过多的萃取溶剂会造成 CoQ₁₀ 浓度的进一步稀释。萃取溶剂过少又不能保证 CoQ₁₀ 的定量萃取。本文比较了血浆和正丙醇在不同体积比情况下，CoQ₁₀ 的萃取回收率变化，其结果见表 1。从表 1 结果可看出，实验采用 1 mL 正丙醇定量萃取 0.3 mL 血浆较适宜。

2.3 流动相的选择

比较异丙醇和甲醇在不同配比、不同流速情况下 CoQ₁₀ 的色谱行为时，发现当两者的体积比为 1 : 9 及流速为 1.5 mL/min 时，CoQ₁₀ 峰能很好地和干扰峰分离。在此条件下，标样和血样的色谱行为分别见图 2 和图 3。

2.4 方法的线性和灵敏度考察

准确量取一定体积的 CoQ₁₀ 贮备液，配制 CoQ₁₀ 质量浓度分别为 0.05、0.2、0.4、0.8、1.2、2.0、4.0、10.0、20.0 mg/L 的系列标液。分别取标液 0.3 mL，加水 0.3 mL，正丙醇 0.7 mL（与血浆相同的醇水比例），振荡混匀，按上述“1.2.3”分析条件进行分析。结果表明，在 0.05 ~ 20.0 mg/L 范围内，峰高与浓度呈良好的线性关系， $y = 1\,458.4x + 15.095$ （ y 为峰高， x 为浓度，相关系数 $r = 0.999\,8$ ）。方法的检出限为 0.03 mg/L（ $S/N = 3$ ）。

2.5 测定的精密度及回收率考察

平行取 3 份相同的混合血浆，振荡摇匀后，按上述方法进行 CoQ₁₀ 含量的测定，其结果为 0.57 ± 0.008 mg/L（ $\text{mean} \pm \text{SD}$ ），测定精密度（相对标准偏差）为 1.4%。

回收率实验采取实际样品加标样的方法测得，取“精密度”实验中的同一血浆样品，从中称取 12 份平行样，平分为 3 组，每组依次加入 10、20、30 μL CoQ₁₀ 标液（20 mg/L），分别记录为加标血样 1、加标血样 2 及加标血样 3，按上述方法检测，其结果见表 2。

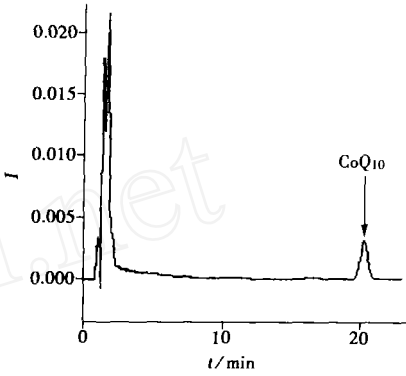


图 2 标样色谱图
Fig. 2 Chromatogram of CoQ₁₀ standard

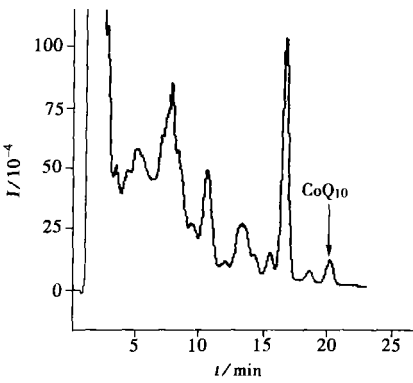


图 3 血浆样色谱图
Fig. 3 Chromatogram of plasma

表 2 样品的加标回收率 (n = 3)
Table 2 Recovery of CoQ₁₀ spiked to a plasma sample (n = 3)

Sample	Original $\rho_0 / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Added $\rho_A / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Found $\rho_F / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Recovery $(\bar{R} \pm \text{SD}) / \%$
Spiked plasma 1 (加标血样 1)	0.57 ± 0.008	0.70	1.32 ± 0.02	103.0 ± 1.6
Spiked plasma 2 (加标血样 2)	0.57 ± 0.008	1.40	2.00 ± 0.03	101.5 ± 1.7
Spiked plasma 3 (加标血样 3)	0.57 ± 0.008	2.10	2.78 ± 0.15	104.2 ± 5.7

参考文献:

[1] KOMMURU T R, KHAN M A, ASHRAFM, et al A simplified chromatographic method for quantitative determination of coenzyme Q₁₀ in dog plasma[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1998, 16: 1037 - 1040.
[2] GROSSI G, BARGOSSIA M, FDRELLA P L, et al Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of coenzyme Q₁₀ in plasma[J]. J Chromatogr, 1992, 593: 217 - 226.
[3] JOANNA K, BOZENA M, JAN NA P J. Application of derivative spectrophotometry for determination of coenzyme Q₁₀ in pharmaceuticals and plasma[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1998, 17: 1345 - 1350.
[4] 方兴华, 徐宏祥. 一阶导数紫外光谱法测定辅酶 Q₁₀ 胶囊的含量 [J]. 中国生化药物杂志, 2000, 21(3): 133 - 134
[5] WANG Q, LEE B L, ONG C N. Automated high-performance liquid chromatographic method with pre-column reduction for the determination of ubiquinol and ubiquinone plasma[J]. J Chromatogr, B, 1999, 726: 297 - 302
[6] 马金才, 宋秀红. 测定人血浆中辅酶 Q₁₀ 的反相高效液相色谱法 [J]. 分析测试学报, 2002, 21(6): 89 - 91.

(下转第 111 页)

的重要因素。实验中比较了不同电压 (6 ~ 30 kV)对分离结果的影响，发现电压太低 (6 kV)，出峰时间较长，大约在 26 min 左右，提高电压，出峰时间明显提前，综合考虑了电压对分离度和柱效的影响，选择 15 kV 为最佳检测电压。

2.5 线性范围和精密度实验

在最佳的实验条件下，将青蒿素标准品进样 6 次，迁移时间和峰面积的相对标准偏差分别为 1.2%和 3.5%。青蒿素标准品在 20 ~ 280 mg/L 范围内峰高 (Y)与质量浓度 (ρ, mg/L)之间呈现良好的线性关系，其线性回归方程为： $Y = 2.02 + 102 \rho$ ， $r = 0.9956$ ，检出限为 3.2 mg/L。

2.6 样品测定和加标回收实验

按照 1.3 制备好样品溶液，在最佳的实验条件下进行测定，其毛细管电泳图如图 2 所示。分别加入 1.52、8.05、12.0 mg 对照品进行加标回收，实验结果如表 1 所示。

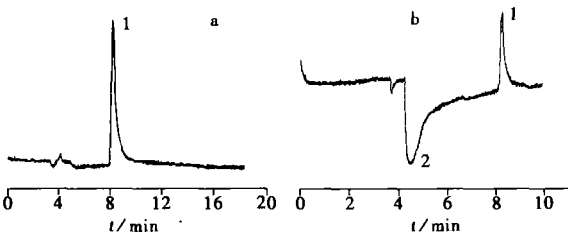


图 2 对照品 (a)和样品 (b)的毛细管电泳图
Fig. 2 Electropherogram of standard (a) and sample (b)
1. artemisinin

表 1 样品的测定结果及回收率

Table 1 Determined results and recovery			
Original $\rho_0 / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Added m_A / mg	Found $\rho_F / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Recovery $R / \%$
10.0	1.52	11.4	99
10.0	8.05	18.1	100
10.0	12.0	21.2	96

参考文献：

[1] 宋振玉, 赵凯存. 青蒿素及其活性衍生物在生物样品中的测定及代谢动力学研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 1989, 5(1): 12

[2] 沈旋坤, 严克东, 罗峰渊, 等. 紫外分光光度法测定青蒿素的含量 [J]. 药物分析杂志, 1983, (1): 24

[3] 张积强, 陈 强, 刘宗怀, 等. 青蒿中青蒿素含量的测定 [J]. 陕西化工, 1996, (3): 36 - 38

[4] 黄海滨, 岑家铭, 奉建芳, 等. RP - HPLC 测定青蒿中青蒿素的含量 [J]. 广西大学学报: 自然科学版, 1994 (19): 194 - 196

[5] CHENG Y Q, HONG L F, LU Y, et al On-line conversion and determination of artemisinin and its kinetic parameters using orthogonal design by coupling of flow injection with capillary electrophoresis [J]. Analytica Chimica Acta, 2004, (525): 239 - 245

[6] CHEN H L, WANG K K, PU Q S, et al On-line conversion and determination of artemisinin using a flow-injection capillary electrophoresis system [J]. Electrophoresis, 2002, (23): 2865 - 2871

[7] CHRISTEN P, VEUTHEY J L. New trends in extraction, identification and quantification of artemisinin and its derivatives [J]. Current Medical Chemistry, 2001, (18): 1827

(上接第 108 页)

[7] 周田彦, 孙华东, 张大卫, 等. 多剂量口服给药后辅酶 Q₁₀缓释片和普通片在健康人体内的血药浓度 [J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(3): 189 - 192

[8] KAPLAN P, SEBESTANOVA N, TURAKOVA J, et al Determination of Coenzyme Q₁₀ in human plasma [J]. Physiol Res, 1996, 45(1): 39 - 45

[9] TANG P H, MLES M V, DEGRAUW A, et al HPLC analysis of reduced and oxidized coenzyme Q₁₀ in human plasma [J]. Clinical Chemistry, 2001, 47(2): 256 - 265

[10] LIIESCU S C, DVAD I G, RADU G L, et al Voltammetric determination of coenzyme Q₁₀ at a solid glassy carbon electrode [J]. Instrumentation Science & Technology, 2001, 29(2): 109 - 116

[11] BATTNO M, FERRIE, GROTTIS Free radical scavenging activity of coenzyme Q measured by a chemiluminescent assay [J]. Analytica Chimica Acta, 1991, 255: 367 - 371

[12] ROKOS J A. Determination of ubiquinone in subnanomole quantities by spectrofluorometry of its product with alkaline ethylcyanoacetate [J]. Anal Biochem, 1973, 56(1): 26 - 33

[13] LONG Y T, YU Z H, CHEN H Y. Determination of coenzyme Q₁₀ by in situ EPR spectroelectrochemistry [J]. Electrochemistry Communications, 1999, 1: 194 - 196