

高效液相色谱法测定辅酶 Q₁₀ 冻干乳在大鼠体内血药浓度及其初步药动学研究

冯秀珍^{1,2}, 丁燕飞¹, 丁劲松¹, 姚 瑶¹

(1. 中南大学 药学院, 湖南 长沙 410013; 2. 湖南省常德市药品检验所, 湖南 常德 415000)

摘要: 目的 建立大鼠体内辅酶 Q₁₀ 血药浓度测定方法, 并研究辅酶 Q₁₀ 冻干乳在大鼠体内初步药动学。方法 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm 5 μm); 流动相: 甲醇-无水乙醇(30:70); 柱温: 30 °C; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 275 nm。结果 辅酶 Q₁₀ 在 0.17 ~ 21.46 μg/mL 范围内线性关系良好($r=0.9998$ $n=6$), 最低定量浓度为 0.17 μg/mL 相对回收率均在 90% ~ 110% 范围内。RSD 小于 15%。辅酶 Q₁₀ 冻干乳静脉注射后在大鼠体内药动学呈二室开放模型。其主要药动学参数: AUC_{0-∞} 为 26.82(μg · h) / mL, $t_{1/2\alpha}$ 为 0.15 h, $t_{1/2\beta}$ 为 6.31 h。结论 该方法简便、准确, 可用于测定大鼠体内辅酶 Q₁₀ 血药浓度。

关键词: 辅酶 Q₁₀; 冻干乳; 血药浓度

中图分类号: R969.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-4678(2011)05-0390-03

Determination of drug content in rat plasma after injection coenzyme Q₁₀ lyophilized emulsion by HPLC

FENG Xiu-zhen^{1,2}, DING Yan-fei¹, DING Jin-song¹, YAO Yao¹

(1. School of Pharmacy, Central South University, Changsha 410013, China;

2. Changde Institute for Drug Control, Hunan Province, Changde 415000, China)

Abstract: Purpose To establish a HPLC method for the quantification of coenzyme Q₁₀ in rat plasma and to study on the pharma cokinetics of coenzyme Q₁₀ lyophilized emulsion in rat. **Methods** Analytical column: Elite Hypersil BDS C₁₈(4.6 mm × 200 mm 5 μm), mobile phase: methanol-dehydrated alcohol (30:70); detection wavelength: 275 nm, temperature: 30 °C and flow rate: 1.0 mL/min. **Results** Coenzyme Q₁₀ had a good linear relation in the range of 0.17-21.46 μg/mL($r=0.9998$ $n=6$). The limit of quantification was 0.17 μg/mL. The relative recovery was in the range of 90% -110% and the RSD of the inter and intra day were all less than 15%. The blood concentration of coenzyme Q₁₀ in rat is accordance with two-compartment open model and its pharmacokinetics reference data is: AUC_{0-∞}: 26.82(μg · h) / mL $t_{1/2\alpha}$: 0.15 h $t_{1/2\beta}$: 6.31 h. **Conclusion** The method is simple, precise and applicable to the pharmacokinetic study of coenzyme Q₁₀ in lyophilized emulsion in rat.

Key words: coenzyme Q₁₀; lyophilized emulsion; plasma drug concentration

辅酶 Q₁₀ 是广泛存在于各类细胞中的脂溶性类维生素物质, 是人体内不可缺少的内源性物质, 临床上广泛应用于心肌梗死、慢性或充血性心力衰竭、高血压、糖尿病、帕金森病、癌症及艾滋病等的辅助治疗^[1]。辅酶 Q₁₀ 冻干乳剂是可供注射用的新剂型,

具有载药量大、稳定、便于贮存运输等优点^[2-4]。本实验建立测定大鼠体内辅酶 Q₁₀ 血药浓度方法, 并对辅酶 Q₁₀ 冻干乳在大鼠体内药动学作初步研究。

1 材料

辅酶 Q₁₀ 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 611-200102); 辅酶 Q₁₀ 冻干乳(中南大学药剂教研室制备); 维生素 K₁(安徽万和制药有限公司); 无水乙醇、甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

收稿日期: 2010-06-04

作者简介: 冯秀珍, 女, 副主任药师; 姚 瑶, 女, 通信作者, 副

教授, 主要从事药物新剂型研究。Tel: 0731-82650367, E-mail: yaoyao367@yahoo.com.cn

UV/Vis 检测器、Lc-solution 工作站(日本岛津)。

Wistar 大鼠 雄性,上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2007-005。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil BDS C_{18} 柱(4.6 mm × 200 mm 5 μ m);流动相: 甲醇-无水乙醇(30:70);柱温 30 $^{\circ}$ C;检测波长: 275 nm;进样量: 20 μ L。内标为含约 1.5 μ g/mL 维生素 K_1 的无水乙醇溶液。

2.2 给药方案及大鼠血样采集

取健康成年 Wistar 大鼠 12 只 雄性 随机分配成 2 组(冻干乳组、空白组),每组 6 只,实验前禁食 12 h,自由饮水,按 0.8 mg/kg 剂量尾静脉注射给药,于给药前和给药后 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 眼眶静脉取血约 250 μ L, 3 000 r/min 离心 2 min,取血浆于 -20 $^{\circ}$ C 保存。每取 4 个时间点血样,灌胃给予大鼠生理盐水 2 mL,以保持血容量。

2.3 对照品溶液的配制

精密称取辅酶 Q_{10} 对照品 9.87 mg,加无水乙醇溶解并稀释至 100 mL,得对照品贮备液。再用无水乙醇稀释成含辅酶 Q_{10} 0.17, 0.33, 0.67, 1.34, 2.68, 5.36, 10.73 和 21.46 μ g/mL 的系列标准溶液。

2.4 血浆样品处理

取血浆 100 μ L,加入内标溶液 50 μ L,30 $^{\circ}$ C 水浴吹干,加萃取液[正己烷-无水乙醇(8:1)混合液] 4 mL,涡旋混合 60 s 后 2 000 r/min 离心 5 min,吸取上层萃取液 3.0 mL 于离心管中,置 30 $^{\circ}$ C 水浴上吹干,加无水乙醇 100 μ L 溶解即得。

2.5 方法专属性

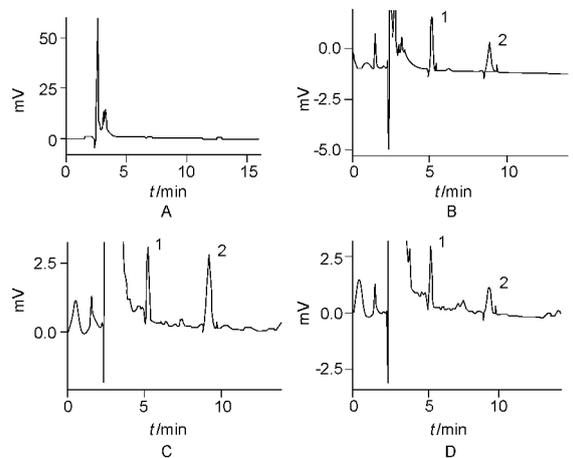
取 2.4 项下处理好的空白大鼠血浆样品、空白大鼠血浆加对照品及内标样品、给药后的大鼠血浆样品以及含对照品和内标的溶液分别进样,记录色谱图,结果表明辅酶 Q_{10} 及内标与血浆中杂质分离良好,内源性物质不干扰测定,结果见图 1。

2.6 线性范围和定量下限

分别取辅酶 Q_{10} 系列标准溶液 100 μ L,加入空白血浆 100 μ L 后,按 2.4 项下自加入内标起操作并进样,以辅酶 Q_{10} 峰面积与内标峰面积之比 R 为纵坐标,辅酶 Q_{10} 浓度 C 为横坐标绘制标准曲线,得标准曲线回归方程: $R = 1.3657 C + 0.0294$ ($r = 0.9998$ $n = 6$)。最低定量浓度为 0.17 μ g/mL, RSD ($n = 6$) 为 5.35%。

2.7 萃取回收率

分别取 2.3 项下含辅酶 Q_{10} 5.36, 1.34,



1. 内标; 2. 辅酶 Q_{10}

1. Internal standard; 2. Co Q_{10}

A. 空白血浆; B. 辅酶 Q_{10} + 内标; C. 空白血浆 + 辅酶 Q_{10} + 内标;
D. 给药后血浆样品

A. blank plasma; B. Co Q_{10} + Internal standard; C. blank plasma +
Co Q_{10} + Internal standard; D. The rat blood sample after administered

图 1 高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

0.33 μ g/mL 的标准溶液各 5 份,每份取 100 μ L,加入空白血浆 100 μ L 后,按 2.4 项下自加入内标起操作;同时取上述相同浓度辅酶 Q_{10} 标准溶液加入内标溶液,不经萃取直接氮气吹干,用前加 100 μ L 无水乙醇溶解。分别进样,计算辅酶 Q_{10} 与内标的回收率。3 种浓度血浆样品辅酶 Q_{10} 的萃取回收率分别为: (92.09 \pm 2.59)%, (89.39 \pm 2.38)%, (93.80 \pm 1.46)%, ($n = 5$); 内标的萃取回收率分别为: (93.27 \pm 1.41)%, (94.56 \pm 2.69)%, (95.16 \pm 1.42)%, ($n = 5$)。结果表明辅酶 Q_{10} 与内标萃取回收率较高且差别不大,符合血样测定要求。

2.8 方法回收率和精密度

取含辅酶 Q_{10} 5.36, 1.34, 0.33 μ g/mL 的标准溶液,加入空白血浆 100 μ L 后,按 2.4 项下自加入内标起同法操作,每个浓度各配制 5 份,连续测定 5 d,计算回收率及日内、日间精密度。3 种浓度血浆样品辅酶 Q_{10} 的回收率分别为: (102.0 \pm 8.86)%, (102.6 \pm 5.28)% 和 (97.8 \pm 3.79)%, ($n = 5$),方法精密度见表 1。

2.9 稳定性考察

将含辅酶 Q_{10} 5.36, 1.34, 0.33 μ g/mL 的血样于 -20 $^{\circ}$ C 放置,冷冻-融化循环 3 次,实验中均无明显降解。将 3 种浓度的辅酶 Q_{10} 血样配制后放置 12 h 内稳定。将 3 种浓度的辅酶 Q_{10} 血样 -20 $^{\circ}$ C 放置 10 d 后,辅酶 Q_{10} 浓度变化不大,浓度测定结果的 RSD 均小于 7%。

表 1 精密度测定结果($n=5$)Tab.1 Result of intra-day and inter-day precision($n=5$)

浓度 /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	日内精密度		日间精密度	
	实测浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	RSD/%	实测浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	RSD/%
0.33	0.39 \pm 0.04	6.47	0.38 \pm 0.06	10.91
1.34	1.30 \pm 0.06	4.68	1.30 \pm 0.06	4.68
5.36	5.10 \pm 0.11	3.27	5.19 \pm 0.11	3.17

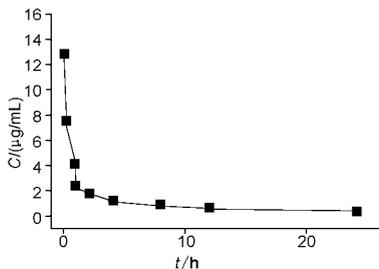
图 2 注射给药后辅酶 Q_{10} 平均血药浓度-时间曲线

Fig.2 Mean plasma concentration-time curve of CoQ_{10} in rats after iv coenzyme Q_{10} in lyophilized emulsion

2.10 血浆样品测定及初步药动力学测定结果

12 只大鼠按 2.2 项下给药及采集血样后,再按 2.4 项下处理,进样分析,测得平均血药浓度-时间曲线见图 2。

血药浓度-时间数据利用 DAS 2.1.1 版药动力学分析软件处理。结果表明,静注辅酶 Q_{10} 冻干乳后辅酶 Q_{10} 在大鼠体内的药动力学行为符合二室开放模型。求得药动力学参数如下: $t_{1/2\alpha}$ 为 (0.15 \pm 0.04) h, $t_{1/2\beta}$ 为 (6.31 \pm 2.84) h, K_{10} 为 (0.84 \pm 0.15) h^{-1} , K_{12} 为 (3.90 \pm 1.83) h^{-1} , K_{21} 为 (0.39 \pm 0.65) h^{-1} , AUC_{0-24} 为 (22.80 \pm 5.42) ($\mu\text{g} \cdot \text{h}$)/mL, $AUC_{0-\infty}$ 为 (26.82 \pm 6.70) ($\mu\text{g} \cdot \text{h}$)/mL。

3 讨论

6 只空白大鼠与制剂同时间点取样,同法测定各取样时间点内源性辅酶 Q_{10} 浓度,在各时间点均未检测出明显内源性辅酶 Q_{10} 。大鼠血浆中主要含辅酶 Q_9 ^[5],空白内源性辅酶 Q_{10} 的量本实验方法灵敏度范围内未检出,因此实验中未考虑内源性辅酶 Q_{10} 的影响。

有报道,萃取时分别加入无水乙醇及正己烷,然后进行萃取操作^[5],本实验将无水乙醇及正己烷按比例混合后一次加入,减少操作步骤,同时经比较两

种方法测定结果没有明显差异。

选用正己烷-无水乙醇为萃取溶剂^[6],考察了不同比例(5:1,6:1,7:1,8:1,9:1,10:1,11:1,12:1)的萃取效果。结果表明,无水乙醇比例增加,萃取效率提高,但乳化严重,管壁上固体物多,正己烷层与醇水混合层界面不清晰。当大于 9:1 时,萃取效率急剧下降,8:1 时萃取效率最高,油水界面最清晰,不发生乳化。因此选择正己烷-无水乙醇(8:1)为萃取溶剂。

文献报道测定辅酶 Q_{10} 血样时采用辅酶 Q_9 作为内标^[7],因大鼠血中含内源性辅酶 Q_9 ,干扰测定,我们选用维生素 K_1 作为内标,测定结果良好,内标放置稳定,处理过程中不降解。

由于辅酶 Q_{10} 脂溶性强,乳剂可被动靶向于含巨噬细胞丰富的组织如肝、脾、淋巴等器官,因此辅酶 Q_{10} 冻干乳注射给药后快速分配 $t_{1/2\alpha}$ 较小。

参考文献:

- [1] 钱雪,王祖巧,韩国平.辅酶 Q_{10} 的药理与应用[J].食品与药品,2006,8(1):16-19.
- [2] 丁燕飞,姚瑶,陶昱斐,等.辅酶 Q_{10} 亚微乳注射剂的制备及其性质研究[J].中南药学,2007,5(5):448-451.
- [3] 冯秀珍,姚瑶,丁燕飞,等.高效液相色谱法测定注射用辅酶 Q_{10} 冻干乳含量及有关物质[J].中南药学,2008,6(3):298-230.
- [4] 李玉林,董志,彭力,等.辅酶 Q_{10} 冻干乳剂的研究[J].中国生化药物杂志,2009,30(5):305-308.
- [5] Ernster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function [J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1271(1): 195-204.
- [6] 肖淑华,魏广力,陆榕,等.辅酶 Q_{10} 片的人体生物利用度研究[J].中国临床药理学与治疗学,2000,5(1):39-41.
- [7] 张伟英,李士敏,王彤文,等.辅酶 Q_{10} 片药动力学与人体相对生物利用度试验[J].中国医院药学杂志,2004,24(9):257-259.