

文章编号 :1009 - 038X(2002)04 - 0420 - 04

发酵液中辅酶 Q₁₀ 的分离纯化和定量分析

吴祖芳^{1,2}, 堵国成¹, 陈坚¹

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036; 2. 宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波, 315211)

摘要:在辅酶 Q₁₀ 发酵菌体提取方法筛选的基础上, 用薄层色谱(TLC)、紫外光谱(UV)结合高效液相色谱(HPLC)方法对提纯样品进行定性和定量分析. 试验结果表明:采用丙酮悬液超声处理, 有机溶剂萃取 5 h, 由薄层色谱结合紫外光谱法定量分析辅酶 Q₁₀, 得到较精确的结果, 为发酵法生产辅酶 Q₁₀ 的分离和测定提供了一种较有效的方法.

关键词:辅酶 Q₁₀; 定量分析; 鉴定

中图分类号: Q 552

文献标识码: A

Studies on the Purification and Quantitative Analysis of Coenzyme Q₁₀ in Culture

WU Zu-fang^{1,2}, DU Guo-cheng¹, CHEN Jian¹

(1. School of Biotechnology, Southen Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Coenzyme Q₁₀ was an important pharmaceutic functional material. The purity of the preparations of CoQ₁₀ was determined by TLC, UV and high performance liquid chromatography on the base of selected pretreatments of the fermentation culture with proper organic solvent extraction. The results showed as followings: adopting acetone solution ultrasonic treatment, extracting time 5 hours, then an accurate analysis result was obtained by using TLC separation and UV absorbance. They could be efficient methods for analysis of industrial fermentation production of Coenzyme Q₁₀.

Key words: coenzyme Q₁₀; quantitative analysis; identification

辅酶 Q₁₀ 又叫泛醌、癸烯醌, 是一类脂溶性醌类化合物, 化学名称为 2-β-二甲氧基-5-甲基-6-癸烯基苯醌. 辅酶 Q₁₀ 为黄色或橙黄色结晶性粉末, 无臭无味, 不溶于水, 在氯仿、苯、丙酮或石油醚中

溶解, 熔点为 48.0~50.0℃, 相对分子质量 863.4; 在动植物、微生物等细胞体内与线粒体内膜相结合, 是生物体呼吸链中重要递氢体. 辅酶 Q₁₀ 作为一种多功能性的生化药物, 在临床中有着广泛的用

收稿日期 2002-03-05; 修订日期 2002-05-20.

作者简介: 吴祖芳(1963-)男, 浙江奉化人, 发酵工程博士研究生, 副教授.

万方数据

途^[1,2] 辅酶 Q₁₀的生产方法主要有动植物组织提取法,化学合成法和微生物发酵法;与其它制备方法相比,微生物发酵法生产具有原料成本低、易控制及可实现大规模生产的特点,能满足该药物在临床上的需要。

辅酶 Q₁₀是微生物发酵的胞内产物,因此,发酵产物辅酶 Q₁₀必须经分离纯化。高效液相色谱分析方法对样品要求较高,分析仪器昂贵且分析费时。因此,需找到一种简便、准确且相对快速的测定发酵液中辅酶 Q₁₀的方法。实验利用有机溶剂萃取、薄层色谱分离及紫外分光光度法等方法分离和测定辅酶 Q₁₀,为进一步大规模发酵生产控制和成分分析提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器

层析硅胶 GF254-薄板(10 cm × 20 cm); EZ585Q 冷冻干燥机:美国 FTS systems Inc 制造;高速离心机;超声波细胞破碎仪;TU-1800 自动扫描可见紫外分光光度计:北京普析通用仪器有限公司制造;高效液相色谱仪:Shimadzu model LC-6AD 型液相色谱仪。

1.2 主要试剂

无水乙醇,甲醇,丙酮,石油醚,氯仿,苯,乙醚,己烷,异辛烷,异丙醇等均为分析纯。

1.3 样品

进口辅酶 Q₁₀标准品:Sigma 公司产品,舟山海力生制药公司惠赠。

1.4 辅酶 Q₁₀的制备

制备流程:发酵液(实验室制备,菌种 *Rhizobium radiobacter* WSH2061)→6 500 r/min 离心分离 15 min→冷冻干燥→有机溶剂搅拌抽提→离心去除菌体→减压蒸发干燥→残渣用少量石油醚萃取,收集石油醚层减压浓缩再用水洗涤→无水硫酸钠干燥→定量无水乙醇溶解→薄层层析分离→刮下与标准品同样 R_f 值的斑点→石油醚抽提→蒸发干燥→残余物用约 0.5 mL 乙醇溶解→低温保存待用。

1.5 辅酶 Q₁₀的分析方法

紫外分析法:在波长 190~300 nm 下对待测定样品进行紫外扫描,测定其最大紫外吸收波长,同时在 275 nm 下进行定量测定。

高效液相色谱法:色谱柱为 SpherisorbC18(10 cm × 4.6 mm ID),用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以甲醇/无水乙醇(体积比为 1:1)为流动相,柱温 35℃,检测波长 275 nm,进样量 20 μL。

2 结果与讨论

2.1 辅酶 Q₁₀提取制备方法的确定

由于辅酶 Q₁₀为细胞内物质,主要存在于细胞内线粒体内膜上,其提取效果的好坏直接影响到产品的纯度和得率。提取胞内醌类物质最常用的萃取剂是有机溶剂^[3,4]。对菌体细胞采用 1)甲醇与乙醚体积比为 2:1;2)异辛烷与异丙醇体积比为 3:1;3)甲醇与氯仿体积比为 1:2;4)丙酮直接萃取;5)丙酮悬液超声破碎等方法,结果见图 1。试验结果表明,甲醇与氯仿混合法抽提后易分多层,后续处理困难,最后确定采用丙酮悬液超声处理法。

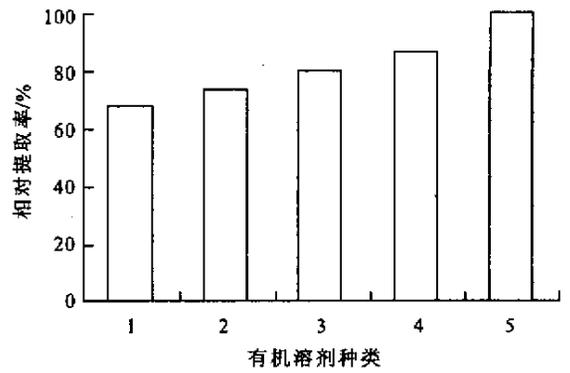


图 1 不同溶剂处理方法对辅酶 Q₁₀提取率的影响

Fig.1 Effects of different solvent treatment methods on the extract yields of CoQ₁₀

2.1.1 溶剂搅拌萃取时间的确定 冷冻干燥细胞经丙酮悬液超声处理后,在 0.5, 1, 3, 5, 8 h 内进行连续搅拌,比较提取效果,结果见图 2。最后确定有机萃取时间为 5 h。

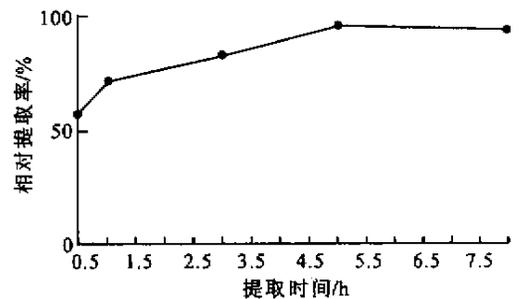


图 2 有机溶剂萃取时间对辅酶 Q₁₀提取率的影响

Fig.2 Effects of extracting time on the extract yields of CoQ₁₀

2.1.2 提取温度对提取效果的影响 采用常温、40、60℃进行提取,结果见图 3。考虑连续保温处理对有机溶剂挥发及目的组成可能造成的影响,最后确定有机萃取温度为常温(25℃)结合间歇加热的方法提取。

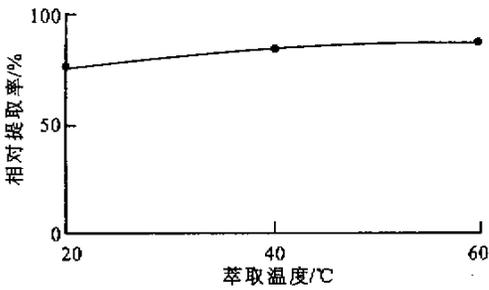


图 3 有机溶剂萃取温度对辅酶 Q_{10} 提取效果的影响

Fig.3 Effects of extracting temperature on the extract effectiveness of CoQ_{10}

2.2 TLC-UV 法测定辅酶 Q_{10} 含量

2.2.1 薄层色谱法分离辅酶 Q_{10} 展开剂的选择

以氯仿与苯(体积比为 1:1)或石油醚与乙醚(体积比为 8:2)等为展开剂,以碘蒸汽为显色剂或直接在紫外光下显色,对辅酶 Q_{10} 样品粗提液进行薄层色谱分离^[5],点样量 $5 \mu\text{L}$,标样参考质量浓度 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$,将显示的斑点与标准品 R_f 值对照;同时,配制质量浓度为 $10 \sim 150 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准品系列溶液,分别确定其最小检测质量浓度,结果见表 1。

表 1 薄层色谱法展开剂的选择及最小检测质量浓度

Tab.1 A selection of display solvent for TLC method and minimum measurement concentration

| 展开剂 | 己烷/二乙醚 (体积比为 85:15) | 氯仿/苯 (体积比为 1:1) | 石油醚/乙醚 (体积比为 8:2) | 苯/丙酮 (体积比为 93:7) |
|--|---------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| R_f 值 | 0.5 | 0.67 | 0.85 | - |
| 最小检测 质量浓度/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 35 | 24 | 50 | - |

苯/丙酮经碘蒸汽和紫外光显色,无斑点;其它展开剂显色斑点大小与质量浓度高低并不相关,只是色泽深浅与样品质量浓度有关,因此,需结合 UV 法进行测定。根据 R_f 值适宜取值范围和检测灵敏度大小,选取氯仿和苯作为展开剂,进行 TLC 分离分析。

2.2.2 紫外分光光度法标准曲线的制作 精确称取辅酶 Q_{10} 标准品 20 mg ,溶于无水乙醇并定容至 50 mL ,然后将此溶液分别稀释至一定体积,得到 $8, 20, 40, 80, 120, 160, 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 等系列质量浓度,在 275 nm 波长下测定吸光度。结果表明,辅酶 Q_{10} 在 $80 \sim 120 \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系较好,其回归曲线方程为 $y = 59.111x - 1.5775$,相关系数 $R^2 = 0.9996$ 。

2.2.3 辅酶 Q_{10} 的紫外吸收曲线比较及定量方法的确立

经上述方法制备的辅酶 Q_{10} 样品,对照标准品,

以无水乙醇作空白,在 $190 \sim 300 \text{ nm}$ 下紫外扫描,其紫外吸收曲线见图 4。

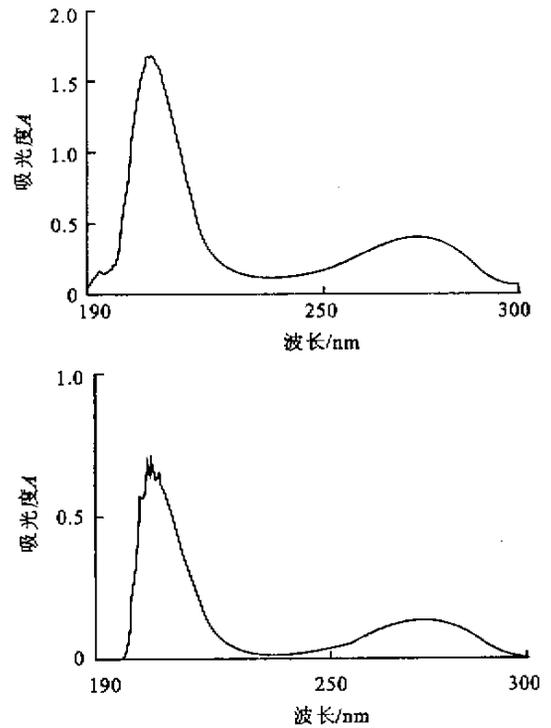


图 4 标准品(上图)及样品(下图)的紫外扫描吸收曲线图

Fig.4 A absorbent curve of UV scan with the standard product and sample

从图 4 可以看出,经有机溶剂萃取和石油醚提取得到的粗提液和辅酶 Q_{10} 标样扫描峰形基本一致,在 $(207 \pm 2) \text{ nm}$ 和 $(275 \pm 1) \text{ nm}$ 处有最大吸收,且试样液在 275 nm 处峰位置发生偏离,还有一些小的杂质峰。这是由于试样经多种有机溶剂提取及细胞内杂质的溶出,这些杂质在 $(207 \pm 2) \text{ nm}$ 和 $(275 \pm 1) \text{ nm}$ 附近有较大吸收的缘故。因此对粗提品直接紫外定量测定会带来一定的误差,于是,通过薄层层析分离进一步提纯处理并结合紫外检测来定量测定辅酶 Q_{10} 的含量。方法如下:粗提品 \rightarrow 点样,在硅胶薄板上展开 \rightarrow 刮下与标准品同样 R_f 值的斑点 \rightarrow 目标物用少量石油醚洗提 \rightarrow 旋转蒸发仪干燥 \rightarrow 残余物用约 0.3 mL 乙醇溶解 \rightarrow 样品。根据收集样品质量浓度大小用酒精溶剂作适当稀释,在 275 nm 处测定吸光值。

2.3 TLC-UV 法与 HPLC 法测定结果比较

对有机溶剂萃取、石油醚洗提和 TLC 分离得到的提取物用一定量无水乙醇溶解后,进行 HPLC 法测定,并与上述实验结果比较,见表 2。

由 TLC-UV 法测得的辅酶 Q_{10} 质量浓度为 HPLC 法的 92%,可能是由于用 TLC 法展开得到

的斑点在再洗提过程中部分损失的缘故.

表 2 辅酶 Q₁₀ 两种测定方法比较

Tab.2 Result comparison of two determination methods of

Coenzyme Q₁₀

| 方 法 | 辅酶 Q ₁₀ 的质量浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
|----------|--|
| TLC-UV 法 | 80.1 |
| HPLC 法 | 87.3 |

2.4 辅酶 Q₁₀ 高效液相色谱分析鉴定

将上述制备的粗提样品经薄板层析后, 再进行高效液相色谱分析, 以鉴定提取效果^[6]. 标样质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 检测波长 275 nm, 色谱图见图 5, 6.

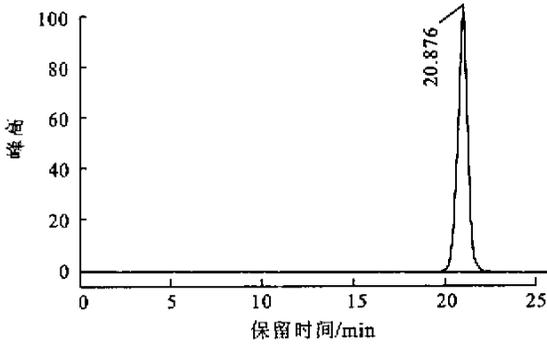


图 5 标样 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 高效液相色谱分析色谱图 (检测波长 275nm)

Fig. 5 A HPLC analysis graph of the standard sample

由图 5, 6 可看出, 辅酶 Q₁₀ 标样和样品色谱峰图中保留时间均为 20.6 min. 用该辅酶 Q₁₀ 的提取方法分离的样品液经层析后, 采用 HPLC 检测发现杂质种类很少, 对辅酶 Q₁₀ 的测定没有干扰. 另外, 通过改变检测波长, 在 206 nm 下对标准样及试样进行 HPLC 检测, 结果得到在保留时间 20.6 min 处标样和试样有一个主峰, 证明为同一种物质.

进一步对测定样品加 0.01 mL 硼氢化钠溶液还原处理, 在同样色谱条件及波长下检测, 在原保留时间处目的物吸收峰消失, 证实为辅酶 Q₁₀.

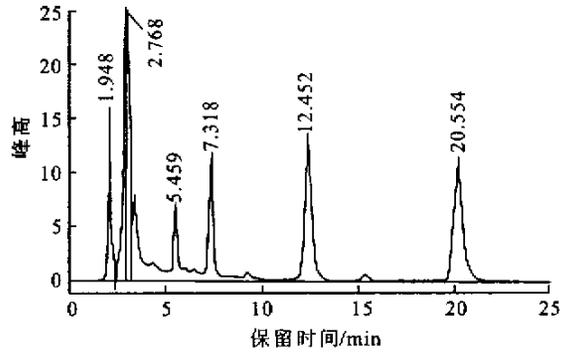


图 6 试样 (粗提品) 高效液相色谱分析色谱图

Fig. 6 A HPLC analysis graph of the extracting sample

3 小 结

1) 通过比较辅酶 Q₁₀ 的提取分离方法, 确定在 6 000 r/min 的条件下转 15 min 的方法收集对数生长期的菌体, 采用丙酮悬液超声处理法, 萃取时间为 5 h.

2) 分离提取过程中要避免辅酶 Q₁₀ 的氧化破坏, 尤其在碱性条件下, 必要时应加抗氧化剂, 如焦性没食子酸. 待测样品要新鲜或经适当低温保存处理. 通过比较不同有机溶剂对浸提收率的影响, 选择毒害相对小、成本低、提取率较高的浸提方法. 通过 HPLC 分析方法鉴定证实, 确定了较理想的发酵产品辅酶 Q₁₀ 的分离提取方法.

3) TLC-UV 法与 HPLC 定量分析法相比, 具有方法较简便, 操作时间短, 成本低, 相对误差较小, 样品处理简单, 是一种较实用的辅酶 Q₁₀ 定量测定方法.

参考文献 :

[1] 吴祖芳, 翁佩芳, 陈坚. 辅酶 Q₁₀ 的功能研究进展 [J]. 宁波大学学报, 2001, 2 : 85 - 88.
 [2] MORTENSEN S A, VADHANAVIKIT S, FOLKERS K. Deficiency of coenzyme Q₁₀ in myocardial failure [J]. *Drugs Exptl Clin Res*, 1984, (7) : 497 - 502.
 [3] KRIVANKOVA L, DADAK V. *Methods in enzymology* [M]. London : Academic Press Inc, 1980.
 [4] 王春林. 中国大豆辅酶 Q₁₀ 的提取、分离与鉴定 [J]. 中国医药工业杂志, 1996, 27 (3) : 102 - 104.
 [5] 庄晓雷, 于树宏. TLC-紫外分光光度法定量测定紫杉醇 [J]. 生物技术, 2001, 11 (1) : 45 - 47.
 [6] MIKATA K, YAMADA. The ubiquinone system in *Hasegawaea japonica* (Yukawa et Maki) Yamada et Banno : A new method for identifying ubiquinone homologs from yeast cells [J]. *IFO Res Comm*, 1999, 19 : 41 - 46.