

碱蓬中辅酶 Q₁₀ 的提取分离

高健, 付进 (1. 盐城工学院化学与生物工程学院, 江苏盐城 224003; 2. 江苏省产品质量监督检验研究院, 江苏南京 210029)

摘要 [目的] 为碱蓬中辅酶 Q₁₀ 的提取分离和工业化生产提供科学依据。[方法] 用 10% KOH- 甲醇的醇碱皂化法从碱蓬中提取辅酶 Q₁₀, 并用硅胶柱层析, 经无水乙醇重结晶后, 得黄色结晶。用熔点测定法和薄层层析法对黄色结晶进行定性鉴定, 用 HPLC 法和 Graven 氏颜色试验法对其进行定量测定。[结果] 无水乙醇重结晶后得到的晶体, 其熔点为 48.6 ~ 50.3, 在碱性条件下, 加入氰基乙酸乙酯后, 生成了蓝色化合物, 证明该结晶是辅酶 Q₁₀。用 Graven 氏颜色试验法测得碱蓬干粉中辅酶 Q₁₀ 的含量约为 63.3 μg/g, 精制辅酶 Q₁₀ 结晶的纯度为 93.2%。用 HPLC 法测得的辅酶 Q₁₀ 含量约为 63.1 μg/g。两种定量分析方法存在良好的线性关系。[结论] 碱蓬是获取辅酶 Q₁₀ 的良好材料, 有很好的开发前景。

关键词 碱蓬; 辅酶 Q₁₀; 提取; 分离

中图分类号 Q552 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)10-03943-02

Extraction and Separation of Coenzyme Q₁₀ from Suaeda salsa

GAO Jian et al (College of Chemical and Biological Engineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng, Jiangsu 224003)

Abstract [Objective] The study aimed to provide scientific basis for the extraction and separation of coenzyme Q₁₀ from Suaeda salsa and its industrial production. [Method] Coenzyme Q₁₀ was extracted from S. salsa by saponification with 10% KOH-methanol. The yellow crystal was obtained through silica gel column chromatography and then recrystallization with anhydrous ethanol. The yellow crystal was qualitatively identified by melting point assay and TLC method and quantitatively determined by HPLC method and Graven colorimetric assay. [Result] The melting point of crystal obtained through recrystallization with anhydrous ethanol was 48.6 ~ 50.3. Under alkali condition, the blue compound was generated after adding ethyl cyanacetate. These testified that the crystal was coenzyme Q₁₀. The content of coenzyme Q₁₀ in dry S. salsa powder determined by Graven colorimetric assay was about 63.3 μg/g. The purity of refined coenzyme Q₁₀ crystal was 93.2%. The content of coenzyme Q₁₀ determined by HPLC method was about 63.1 μg/g. These 2 quantitative analyses had good linear relationship. [Conclusion] S. salsa was good material from which coenzyme Q₁₀ was obtained. It had very good development prospect.

Key words Suaeda salsa; Coenzyme Q₁₀; Extraction; Separation

碱蓬(*Suaeda salsa*)为藜科、碱蓬属一年生草本植物,又名翅碱蓬、黄须菜、盐蒿。野生于海涂或盐场的盐滩之上,无污染,被称为标准的“绿色食品”,幼苗可作蔬菜,种子可榨油,富含不饱和脂肪酸、维生素和微量元素,对人体有重要的保健作用^[1-2]。近年来,一些研究表明,碱蓬中含有辅酶 Q₁₀。辅酶 Q₁₀是动物、植物、微生物等细胞体内能与线粒体内膜相结合,在呼吸链中作为重要的氢的传递者,具有明显的生理作用,是细胞内的天然抗氧化剂及代谢激活剂,作为生化药物具有广泛的疗效。辅酶 Q₁₀是一种醌类化合物,存在于网状内皮组织系统中,能提高机体免疫力,在心脏病治疗中有很好的疗效,同时在恶性肿瘤、急性肝炎、脑血管障碍、高血压、坏血病等疾病中也发挥着重要的作用。目前研究者正在对其进行进一步临床应用研究。辅酶 Q₁₀的特点是无毒副作用,作为一种新药进行产品开发前景广阔^[3-5]。随着辅酶 Q₁₀在医药、食品添加剂等领域的广泛应用,这种产品在我国及全世界的开发势头良好,因此,在我国加快开发、生产这种产品已成为当务之急^[6]。目前,国内外辅酶 Q₁₀的研究主要以化学合成或微生物发酵法,也有少数从动、植物组织中提取辅酶 Q₁₀的研究报告。但迄今对碱蓬中辅酶 Q₁₀的提取研究鲜有报道。笔者结合碱蓬的实际情况,旨在研究碱蓬中辅酶 Q₁₀的提取分离方法,筛选出操作简单、提取效率高、产品纯度高的工艺条件,为盐生植物资源碱蓬的开发利用及实现工业化生产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料。碱蓬幼苗采自盐城市射阳县射阳港盐碱土中。

1.1.2 仪器与试剂。紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);HPLC 高效液相色谱仪(美国戴安公司)。辅酶 Q₁₀标准品(中国药品生物制品检定所);石油醚、甲醇、KOH、乙醚、无水乙醇等均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 辅酶 Q₁₀提取。由于辅酶 Q₁₀见光易分解,所有操作均在较暗光线下进行。盐地碱蓬中辅酶 Q₁₀提取方法参照文献[7]方法,取盐地碱蓬幼苗洗净、快速阴干后,剪成碎段,然后粉碎成粉末干燥,精密称取干燥粉末样品 50 g,加入 7% 焦性没食子酸,搅拌均匀,再加入适量的 10% KOH 的甲醇溶液,混匀,此时组织材料已变成黑色糊状,在 90℃ 回流 30 min 迅速冷却至室温,加入 1 倍量的石油醚,进行多次萃取,合并萃取液,用蒸馏水进行水洗,再以适量的无水硫酸钠除去水分(除去水分使后续处理中辅酶 Q₁₀能更好的与烃类溶剂混溶),除去水分后,将溶液减压浓缩至小体积,放入冰箱,低温析出胆固醇等杂质并进行过滤,得到黄色油状物,准备上硅胶柱进行纯化。

1.2.2 辅酶 Q₁₀分离纯化。辅酶 Q₁₀分离纯化方法参照文献[8]方法,称取适量硅胶,湿法装柱,将浓缩的辅酶 Q₁₀提取液上硅胶柱,先以石油醚洗涤除去杂质,再以 10% 乙醚-石油醚洗脱,收集黄色带部分的洗脱液,减压蒸馏洗脱液,回收乙醚-石油醚,加入少量无水乙醇,于 4℃ 冰箱内放置,得到黄色的结晶。

1.2.3 辅酶 Q₁₀定性鉴定。采用物理和化学结合的方法鉴定分离纯化后的辅酶 Q₁₀^[9]。采用熔点测定法测定辅酶 Q₁₀

基金项目 盐城市科技发展计划资助项目(YK2006223);盐城工学院校级科研基金资助项目(XKY2006030)。

作者简介 高健(1973-),男,江苏盐城人,硕士,讲师,从事生物活性物质研究。

收稿日期 2007-11-19

的熔点,检查辅酶 Q_{10} 熔点是否在49 左右;用Graven 氏颜色试验法,在KOH 碱性条件下,加入氰基乙酸乙酯,因氰基乙酸乙酯能取代辅酶 Q_{10} 的甲氧基并生成蓝色化合物,根据这特征颜色反应检验提取物是否是辅酶 Q_{10} ;采用薄层层析法,称取一定量的硅胶G,湿法铺板,在105 下活化1 h,按常规方法点样,用体积比为80:20 的石油醚- 乙醚作为展开剂,碘蒸气作为显色剂来显示斑点,并用标准品辅酶 Q_{10} 作对照^[5]。

1.2.4 辅酶 Q_{10} 定量分析。配置浓度为10、20、30、40、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的辅酶 Q_{10} 标准品乙醇梯度溶液,分别取辅酶 Q_{10} 标准液2.0 ml,加入无水乙醇3.0 ml,氰基乙酸乙酯1.0 ml,0.5% KOH 溶液1.0 ml,摇匀,均呈蓝色,在620 nm 处测定吸光度,绘制辅酶 Q_{10} 标准曲线(图1),曲线的回归方程

$$Y = 0.0183X + 0.0014 \quad (1)$$

式中, X 为辅酶 Q_{10} 的浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$), Y 为吸光度, $R^2 = 0.9993$,样品测定方法同辅酶 Q_{10} 标准品。

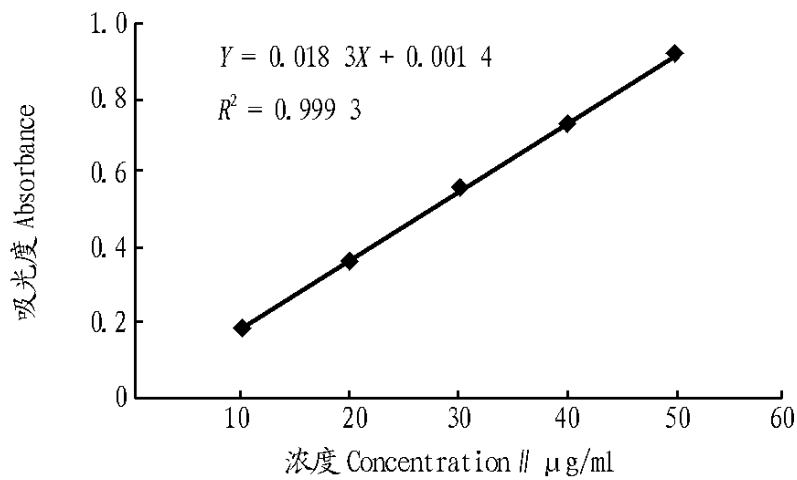


图1 辅酶 Q_{10} 标准曲线

Fig.1 The standard curve of coenzyme Q_{10}

另外,将纯化的结晶溶于无水乙醇中,用HPLC 液相色谱法进行定量分析^[10],以 C_{18} 作为色谱柱,色谱条件为以体积比为13:7 的甲醇- 乙醇作为流动相,检测波长为275 nm,温度为30 ,进样量为20 μl ,流速为1.0 ml/min。

2 结果与分析

2.1 碱蓬辅酶 Q_{10} 的分析鉴定 经硅胶柱分离纯化得到的结晶,经重结晶后,测定晶体的熔点,测定值为48.6 ~ 50.3 ,与文献报道的辅酶 Q_{10} 熔点为49 相一致;用Graven 氏颜色试验法鉴定经硅胶柱分离纯化得到的结晶,发现在碱性条件下,加入氰基乙酸乙酯,生成了蓝色化合物,根据这种特征颜色反应进一步证明提取分离的结晶是辅酶 Q_{10} ;用薄层层析法,以石油醚- 乙醚作为展开剂,碘蒸气作为显色剂,共点了5 个样,如图2 所示,其中T1 为标准品,显色后为1 个斑点,T2 和T3 为硅胶柱分离纯化后经乙醇重结晶后的样品,显色后也分别为一个斑点,且与标准品斑点所在的位置一致,T4 和T5 为提取后未经分离纯化的样品,除了有与对照相一致的斑点外分别还有几个杂斑,可能是其他一些杂质。通过以上3 种鉴定方法可见,用碱蓬提取分离的结晶为辅酶 Q_{10} 。

2.2 碱蓬辅酶 Q_{10} 的含量测定 利用醇碱皂化法得到碱蓬辅酶 Q_{10} 粗提取液,用硅胶柱洗脱分离纯化后,用旋转蒸发仪减压浓缩,在真空冷冻干燥器上蒸干得粉末状精制辅酶 Q_{10} ,经无水乙醇重结晶后,得到黄色结晶。以辅酶 Q_{10} 标准品为标样,得标准曲线。经测定相对于碱蓬干粉,其辅酶 Q_{10} 的含量约为

63.3 $\mu\text{g}/\text{g}$,精制辅酶 Q_{10} 结晶的纯度为93.2%。用HPLC 液相色谱法测得的辅酶 Q_{10} 含量约为63.1 $\mu\text{g}/\text{g}$,这与经化学反应在620 nm 处可见分光光度法测定的值相一致,经进一步分析这两种定量分析方法存在良好的线性关系。由上述结果表明,经纯化后精制辅酶 Q_{10} 结晶中辅酶 Q_{10} 含量很高。

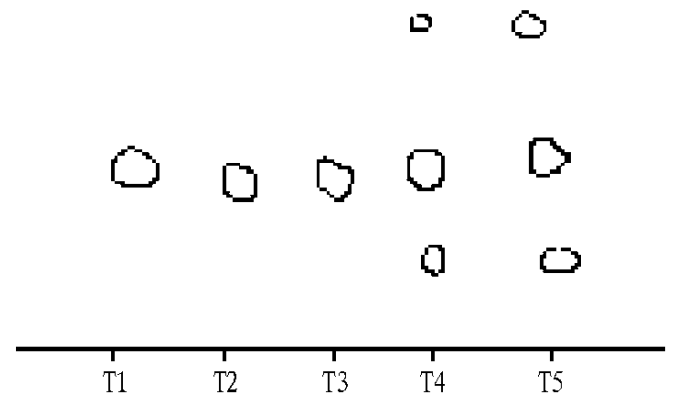


图2 辅酶 Q_{10} 薄层层析图谱

Fig.2 The thin layer chromatogram of coenzyme Q_{10}

3 讨论

辅酶 Q_{10} 见光易分解、易氧化,这为辅酶 Q_{10} 提取分离带来了很大难处,而植物中除了辅酶 Q_{10} 还有色素、脂类等其他一些很复杂的亲脂性的物质,这些情况进一步增大了辅酶 Q_{10} 提取分离试验的难度。为了防止光线对提取辅酶 Q_{10} 的影响,该研究均在较暗的光线下进行试验操作。试验加入焦性没食子酸可以起到抗氧化作用,但仍不能避免一些还原性物质被氧化分解,这将导致部分辅酶 Q_{10} 的损失。用碱醇皂化法提取辅酶 Q_{10} 时,如果采用NaOH- 乙醇法进行皂化,因乙醇的大量存在,再加上皂化需要较长的时间,可能导致辅酶 Q_{10} 环上的甲氧基与乙醇中的乙氧基发生置换,生成了单或双氧化合物^[8],为避免产生这些杂质,试验采用了KOH- 甲醇混合溶剂进行皂化,同时尽可能缩短皂化时间,皂化结束后,采取迅速冷却的方法。

近年来,国内外对辅酶 Q_{10} 的应用研究持续不断,辅酶 Q_{10} 应用前景非常广阔。但是大多数辅酶 Q_{10} 研究集中在化学合成和微生物发酵上。化学合成辅酶 Q_{10} 的前体物来源有限,且反应难度大、效率低;而微生物发酵法,因很难找到理想的菌种,发酵产率低、成本高,制约其应用研究。最近,许多学者将目光转移到动、植物提取上,直接从这些自然资源中提取辅酶 Q_{10} 优势越来越明显。但从动、植物中提取辅酶 Q_{10} 首先要找到理想的材料,在我国沿海滩涂生长着广袤的盐生植物——碱蓬,碱蓬中辅酶 Q_{10} 含量较高,这为开发利用辅酶 Q_{10} 提供了基础。碱蓬中除了含有辅酶 Q_{10} 外,还含有丰富的其他天然化合物。在提取辅酶 Q_{10} 的同时,可以考虑综合利用碱蓬。在不影响辅酶 Q_{10} 提取的前提下,采取适当的生产工艺得到辅酶 Q_{10} 产品,联产其他有活性的化合物。这可以增加经济效益,减少废弃物的排放,但方法上有待进一步研究和提高。

参考文献

- [1] 谷奉天. 开发盐地碱蓬绿色系列食品研究[J]. 滨州教育学院学报, 1999,5(3):43-48.
- [2] 胡博路, 杭瑚. 翅碱蓬的抗氧化活性研究[J]. 中国海洋药物, 2001(4):29-31.
- [3] 欧阳平凯, 胡永红. 辅酶 Q_{10} 的生产及其应用[J]. 化工进展, 1994(4):9-11.

别用IEF和732树脂装填的交换柱吸附L-脯氨酸溶液达到饱和后,用0.1 ml/L氨水进行洗脱。控制淋洗速度为2.5 ml/min,定容收集流出液,并且分析L-脯氨酸浓度。解吸后的IEF再转为氢型,洗涤干燥后得到再生。

由图6可知,纤维柱的洗脱曲线既高又尖,无拖尾现象,表明所吸附的L-脯氨酸能够充分、迅速地被解吸下来。纤维的洗脱率达到88.9%,最大富集倍数为48倍。而树脂柱的洗脱曲线比较宽平,洗脱率为90.1%,最大富集倍数为23倍,从纤维上洗脱下来的L-脯氨酸溶液浓度远高于732树脂。因此,用强酸IEF富集分离L-脯氨酸有利于降低能耗,提高效率。

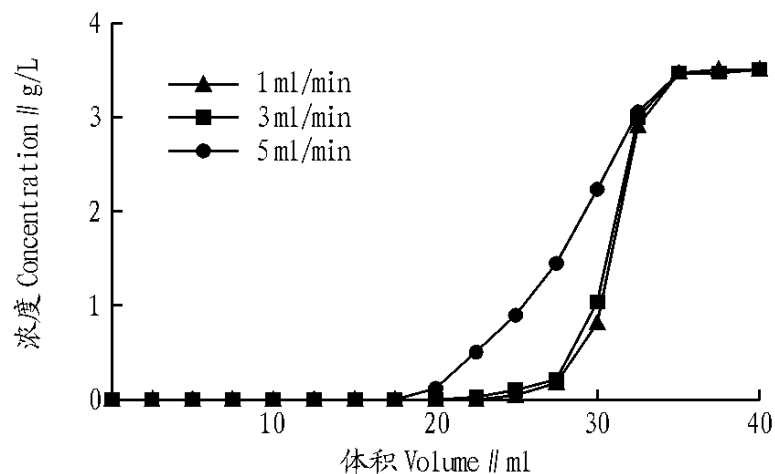


图5 不同流速下L-脯氨酸溶液的穿透曲线

Fig. 5 Breakthrough curves under different flowrate of the L-proline solution

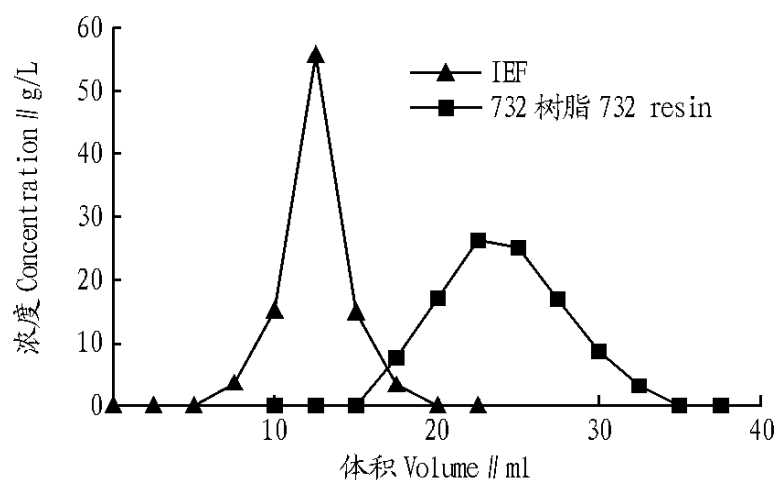


图6 L-脯氨酸溶液在纤维和树脂上的洗脱曲线

Fig. 6 Elution curves of L-proline for ion exchange of fiber and 732 resin

再生后IEF可以重复使用。研究发现,经过20次

吸附-解吸循环后,IEF的交换容量仍达到182.75 mg/g,再生性能稳定。

3 结论

(1) 强酸IEF对L-脯氨酸的静态吸附速率远大于732树脂,吸附在200 s时间内达到平衡。L-脯氨酸溶液在pH值为5时,IEF的吸附量最大。随着温度的升高,强酸IEF对L-脯氨酸的吸附量逐渐减小,吸附过程是放热过程。

(2) 强酸IEF对L-脯氨酸具有很好的吸附能力,L-脯氨酸溶液上柱液的浓度影响纤维饱和吸附量,浓度越高,饱和吸附量越大,但过高的浓度导致穿透点提前。在试验条件下纤维对浓度为3.57 g/L的L-脯氨酸溶液的动态吸附容量达到185.68 mg/g。

(3) L-脯氨酸溶液在流速为3 ml/min时在纤维上的吸附较完全。

(4) 用0.1 ml/L的氨水可将交换柱上吸附的L-脯氨酸溶液充分解吸下来,再生20次后的纤维仍具有很好的吸附性能。

参考文献

- [1] 严希康,李卫东,易向群,等.L-脯氨酸发酵液的预处理[J].华东化工学院学报,1989,15(4):456-460.
- [2] 缪正兴,张仲明,李宝忠.L-脯氨酸的生产及其应用[J].发酵科技通讯,2004,33(2):21-22.
- [3] 高焕春,李文英.从骨胶水解液中分离L-羟脯氨酸和L-脯氨酸[J].天津轻工业学院学报,1997(2):33-37.
- [4] 彭阳峰,陈迎,蔡水洪.离子交换法从醋酸溶液中提取脯氨酸的研究[J].离子交换与吸附,2000,17(6):538-542.
- [5] 周绍箕.化学吸附纤维制备、性能及应用研究进展[J].离子交换与吸附,2004,20(3):279-288.
- [6] SOLDATOV V S, POLUS Z, PAWLOWSKA M, et al. A strong acid nonwoven filtering medium for deep air purification[J]. Fibres and Textiles in Eastern Europe, 2004,12(4):1434-1439.
- [7] 杨海燕,冯长根,曾庆轩.强酸离子交换纤维对碱性氨基酸的吸附性能研究[J].化工进展,2004,23(7):740-742.
- [8] 符若文,杜秀英,林远声,等.强酸性离子交换纤维PVFgSO₃H对碱性氨基酸的分离研究[J].中山大学学报,2001,40(2):45-49.
- [9] 李凯,曾庆轩,李明愉.强酸性离子交换纤维的制备-磺化及吸附性能研究[J].精细石油化工进展,2004,5(10):38-41.
- [10] 姜志新,谌竟清,宋正孝.离子交换分离工程[M].天津:天津大学出版社,1992.
- [11] 李绍军,龚月桦,王俊儒,等.关于茚三酮法测定脯氨酸含量中脯氨酸与茚三酮反应之探讨[J].植物生理学通讯,2005,41(3):365-368.
- [12] 李鑫,曾庆轩,冯长根,等.离子交换纤维对偏二甲胍的吸附性能研究[J].过程工程学报,2006,6(1):23-27.
- [13] 李明愉,曾庆轩,冯长根,等.离子交换纤维吸附儿茶素的热力学[J].化工学报,2005,56(7):1164-1168.

大学学报,2003,22(2):59-62.

- [8] 袁艺.猪心中提取和纯化辅酶Q₁₀(联产GtC)[J].安徽农业大学学报,1997,24(2):200-203.
- [9] 王宗德,曾卫明.辅酶Q₁₀提取分离和测定的研究现状[J].江西林业科技,1999(4):21-24.
- [10] SUKJIN HA, SANG YONG KIM, JINHO SEO, et al. Optimization of culture conditions and scale up to pilot and plant scales for coenzyme Q₁₀ production by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007,74:974-980.

(上接第3944页)

- [4] LENAZ G. Coenzyme Q₁₀ [M]. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1985.
- [5] 云南省动物研究所,江苏省泰州市生物制药厂.从制备细胞色素丙的猪心残渣中分离出辅酶Q₁₀[J].医药工业,1976(2):22-25.
- [6] 《河南化工》编辑部.我国亟待开发辅酶Q₁₀产品[J].河南化工,2002(1):51.
- [7] 王根华,钱和.发酵菌体中辅酶Q₁₀的提取及其测定方法[J].无锡轻工