

人血浆中辅酶 Q₁₀的 HPLC 测定法及其动态研究

丁黎*, 杨劲¹, 华雅萍, 周炜, 张正行, 安登魁

(中国药科大学药物分析研究室, ¹ 药物代谢动力学研究中心, 南京 210009)

摘要 目的:建立人血浆中辅酶 Q₁₀的高效液相色谱检测法,以测定人体内辅酶 Q₁₀的经时变化过程。方法:血浆经无水乙醇沉淀蛋白后,以正己烷提取,进行高效液相色谱法检测。色谱柱为 Spherisorb C₁₈ 10 μm 25 cm × 4.6 mm ID,流动相为无水乙醇-水-冰醋酸(98:2:0.7),检测波长为 275 nm,内标为辅酶 Q₉。结果:在 0.2 ~ 4.0 μg·ml⁻¹浓度范围内峰面积比与浓度呈良好的线性关系, r = 0.9998,方法重现性好,提取回收率大于 90%;以本法测定了 8 名男性健康受试者服用辅酶 Q₁₀制剂前后血浆中辅酶 Q₁₀的浓度经时变化过程。结论:用本法测定人血浆中辅酶 Q₁₀浓度结果满意;人血浆中内源性辅酶 Q₁₀浓度为(763.3 ± 86.3) ng·ml⁻¹,且受饮食及运动量的影响。

关键词 辅酶 Q₁₀; 高效液相色谱法

辅酶 Q₁₀^[1](coenzyme Q₁₀, CoQ₁₀) 商品名为 Ubidecarenone,系动物体内的一种内源性物质,广泛存在于线粒体的内膜中,是组成呼吸链的必要成分,在体内通过线粒体内膜酶系的作用下由对羟基苯甲酸及异戊烯焦磷酸合成。临床上 CoQ₁₀主要用于基础治疗过程中出现的轻度或中度的充血性心力衰竭,以改善浮肿,肺充血,肝肿胀和心绞痛等症状。由于 CoQ₁₀为内源性物质,因此在监测受试者或病人服用 CoQ₁₀制剂后体内 CoQ₁₀浓度变化,需建立一种不同于外源性物质测定的方法。有关 CoQ₁₀血药浓度测定方法至今尚未见报道,虽国外有几篇文献^[2~5]涉及体内 CoQ₁₀的 HPLC 测定方法,但均未在方法的可行性方面进行论证,且采用的样品预处理步骤涉及薄层色谱纯化等,比较繁琐。本文设计了较为方便实用的血浆中 CoQ₁₀的 HPLC 测定方法,并用该法对 8 名健康志愿者 1 d 内血浆中内源性 CoQ₁₀浓度变化情况及口服丹麦 Pharma Nord 公司生产的 CoQ₁₀软胶囊 Bio-Qinon 后的体内 CoQ₁₀血药浓度变化情况进行了研究。

实 验 部 分

1 仪器与试剂

Shimadzu LC-6A 平流泵; Shimadzu SPD10A

可变波长紫外检测器; Shimadzu C-R6A 数据处理机; CoQ₁₀对照品(Sigma 公司); 辅酶 Q₉(Sigma 公司,简称 CoQ₉); Bio-Qinon 软胶囊(丹麦 Pharma Nord 公司,每粒含 CoQ₁₀ 10 mg,批号 97117); 无水乙醇、正己烷、冰醋酸均为分析纯。

2 色谱条件

色谱柱为 Spherisorb C₁₈ 10 μm 25 cm × 4.6 mm ID,流动相为无水乙醇-水-冰醋酸(98:2:0.7),流速 1 ml·min⁻¹,检测波长为 275 nm,灵敏度为 0.0010 AUFS,温度为 22 ~ 23 °C。

3 血药浓度测定方法

由于 CoQ₁₀及内标 CoQ₉遇光不稳定,故样品处理及测定需避光进行。

于暗室中,取血浆 0.6 ml 置离心管中,加 15 μg·ml⁻¹ CoQ₉乙醇溶液 40 μl,摇匀,加无水乙醇 2 ml,涡旋 10 s,加正己烷 5 ml,涡旋 5 min,3 000 r·min⁻¹离心 5 min,取正己烷层 4 ml,于 37 °C 水浴中以氮气流吹干,残渣加无水乙醇 100 μl 溶解,取 20 μl 按上述色谱条件进样分析。

4 受试者

8 名健康男性受试者,体重(64.5 ± 6.3) kg,年龄(21.0 ± 1.0)岁,经生化检验证实肝、肾功能正常,心电图检查正常,精神状态良好。实验前一周及实验期间禁烟酒,并未服用其它任何药物。

5 人血浆中内源性 CoQ₁₀浓度测定方法

8 名受试者先接受饮食控制,包括统一食谱、统一饮食总量、统一用餐时间及限制食用动物性油脂。每日用餐时间为上午 7:00,中午 12:00,下午 5:15。

收稿日期: 1998-06-15

* Tel: (025) 3305996 - 301, Fax: (025) 3301655,

E-mail: dingli 88 @ public 1 . ppt . js . cn

于饮食控制的第3 d早饭后0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0 h于肘静脉取血3 ml, 测定受试者未服药时血浆中内源性CoQ₁₀的浓度变化。

6 CoQ₁₀给药方案及给药后血样的采集

给药方案: 8名受试者从饮食控制的第4 d开始, 每人po Bio-Qinon, 每次剂量为40 mg(tid) 每次间隔8 h, 每天上午7:00开始服药, 连续po药4 d, 第5 d上午再po 1次, 剂量仍为40 mg。

取血时间: 受试者服药后的前4 d, 每天早晨服药前于肘静脉取血1次, 每次3 ml。服药后第5 d于早饭服药后0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0 h于肘静脉取血3 ml, 测定血浆中CoQ₁₀浓度。

结果与讨论

1 血浆提取方法的选择

CoQ₁₀难溶于水, 微溶于乙醇, 易溶于正己烷, 乙醇与正己烷互不相溶。故血样经醇沉后, 以正己烷为提取溶剂可获得较高提取率。实验中考察了以醋酸乙酯、正己烷、苯直接提取血浆的方法, 但CoQ₁₀的提取率均不高。说明CoQ₁₀在血浆中与血浆蛋白结合, 难于以有机溶剂直接提取, 但当血浆中加入乙醇沉淀蛋白后, CoQ₁₀与蛋白质的结合被解除而游离出, 再以正己烷提取可得较高的提取率。

2 HPLC流动相的选择

曾试用甲醇-水(95:5)为流动相^[2~5], 结果CoQ₁₀保留时间太长, 进样后1 h仍不出峰。改用无水乙醇-水(98:2)为流动相, 则色谱行为大为改善, 但血浆中一些内源性物质在色谱图中出现宽而拖尾的干扰峰, 影响测定, 当中性流动相被改为酸性流动相无水乙醇-水-冰醋酸(98:2:0.7)后, 干扰峰被排除, 干扰物出现时间提前, 而流动相酸化后并未导致CoQ₁₀及CoQ₉保留时间的明显改变。

3 色谱行为

血浆样品按上述“血药浓度测定方法”项下分析所得色谱图见图1。CoQ₉及CoQ₁₀的保留时间分别为9.7 min及11.9 min。以CoQ₁₀计算理论塔板数为3191, CoQ₉与CoQ₁₀的分离度为2.7。

4 线性关系考察

取离心管数支, 精密加入不同量的CoQ₁₀及新鲜血浆0.6 ml, 配成相对于新鲜血浆CoQ₁₀浓度增量分别为0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 μg·ml⁻¹的标准含药血浆, 按“血药浓度测定”项下操作, 每种浓

度5份, 记录峰面积。以各管中CoQ₁₀浓度增量为横坐标C, 各管中CoQ₁₀与CoQ₉之峰面积比与新鲜血浆管中CoQ₁₀与CoQ₉之峰面积比(本底)的差值为纵坐标f, 进行回归分析, 得回归方程为 $f = 0.8946C + 0.03403$ $r = 0.9998$, 斜率RSD为2.86%(n=5)。

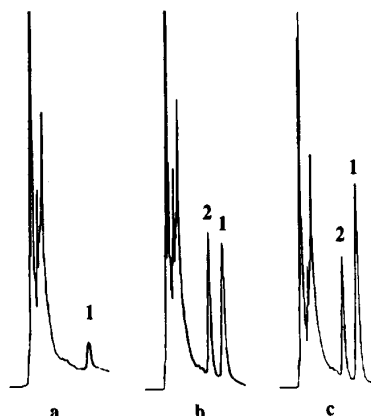


Fig 1 HPLC chromatograms of blank human plasma (a), blank plasma with added CoQ₉ and CoQ₁₀ (b), volunteer plasma after oral administration of Bio-Qinon (c). 1. Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀); 2. Coenzyme Q₉ (CoQ₉).

5 精密度试验

取新鲜血浆数份, 分别加入CoQ₁₀标准溶液使其中CoQ₁₀浓度增量分别为0.5, 2.0, 3.0 μg·ml⁻¹, 按“血药浓度测定方法”项下操作, 每种浓度做5份样品, 记录峰面积, 测定日内RSD和5 d内的日间RSD。结果表明0.5, 2.0, 3.0 μg·ml⁻¹ 3种浓度的日内RSD(n=5)分别为5.68%, 1.18%和0.87%; 日间RSD(n=5)分别为8.22%, 4.12%和2.15%。

6 提取回收率

取CoQ₁₀标准溶液适量于离心管中, 配成含CoQ₁₀ 0.5, 2.0, 3.0 μg·ml⁻¹的标准溶液, 每种浓度5份, 每份0.6 ml, 加入15 μg·ml⁻¹ CoQ₉乙醇液40 μl, 混匀, 吹去溶剂, 加无水乙醇100 μl, 混匀, 取20 μl进样分析, 记录色谱图, 并计算CoQ₁₀的峰面积与CoQ₉的峰面积之比(fs)。另取离心管数支, 加入不同量的CoQ₁₀及新鲜血浆0.6 ml, 配成相对于新鲜血浆CoQ₁₀浓度增量分别为0.0, 0.5, 2.0, 3.0 μg·ml⁻¹的标准含药血浆, 每种浓度做5份, 每份0.6 ml, 加无水乙醇2 ml, 涡旋10 s, 加正己烷5 ml, 涡旋5 min, 3 000 r·min⁻¹离心5 min, 取正己烷层4

ml, 加入 $15 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ CoQ_9 乙醇溶液 $40 \mu\text{l}$, 混匀, 氮气流吹干, 用无水乙醇 $100 \mu\text{l}$ 溶解, 精密吸取 $20 \mu\text{l}$ 进样分析, 记录色谱图, 计算各管 CoQ_{10} 与 CoQ_9 之峰面积比与新鲜血浆管中 CoQ_{10} 与 CoQ_9 之峰面积比的差值 (f_x)。上述 $\frac{5}{4} f_x$ 与 f_s 的比值即血浆中 CoQ_{10} 的提取回收率 ($R\%$), 回收率按下式计算: $R\% = \frac{5}{4} f_x / f_s \times 100\%$ 。结果表明 $0.5, 2.0, 3.0 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 3 种浓度增量的提取回收率 ($n=5$) 分别为 $93.6\%, 95.6\%$ 和 98.1% 。

7 人血浆中 CoQ_{10} 浓度的动态研究

7.1 人血浆中内源性 CoQ_{10} 的浓度

日常饮食中, 特别是动物油脂及脏器中含有一定量的 CoQ_{10} , 饮食的品种及数量直接影响体内 CoQ_{10} 的血浓, 因此在测定人血浆中内源性 CoQ_{10} 浓度时, 受试者的饮食需加以控制。饮食控制的第 3 d 测得 8 名受试者内源性 CoQ_{10} 的平均血浓为 $(763.3 \pm 86.3) \text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, 且正常情况下 1 d 中内源性 CoQ_{10} 血浆浓度波动不大。结果与文献^[3]报道相一致。血药浓度-时间曲线见图 2 及图 3 中 $0 \sim 24 \text{h}$ 部

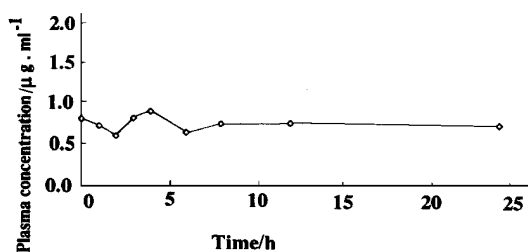


Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of endogenous CoQ_{10} ($n=8$).

分。

7.2 服用 CoQ_{10} 软胶囊后人血浆中 CoQ_{10} 浓度变化

服用 CoQ_{10} 软胶囊后体内 CoQ_{10} 经时变化过程见图 3 中 $24 \sim 144 \text{h}$ 部分。图 3 结果表明: 人体中 CoQ_{10} 血浆浓度随 CoQ_{10} 制剂的连续服用而不断增加, 但增加幅度比较缓慢, 连续服药 4 d (每天服药 3 次) 血药浓度仍未达到稳态, 停药后 CoQ_{10} 血浆浓度下降幅度也较缓和, 停药 24 h 后, CoQ_{10} 血浆浓度仍远大于服药前水平。无论是服药前还是服药后, 人体中 CoQ_{10} 血浆浓度均随受试者的运动量及饮食情况而波动。 CoQ_{10} 是组成呼吸链的主要成分之一, 运动量加大则呼吸运动加快, CoQ_{10} 消耗量必然增加。由于夜间休息未活动, 因此早晨刚起床时受试者血浆中 CoQ_{10} 较高, 起床后随着运动量的增加, 血浆中 CoQ_{10} 浓度开始下降, 但随后由于早餐的饮用, 血浆中 CoQ_{10} 浓度便开始回升, 回升到一定程度又开始下降, 中餐饮用后, 血浆中 CoQ_{10} 又开始回升。这一波动过程可从图 2 及图 3 CoQ_{10} 血浓-时间曲线中 $0 \sim 8 \text{h}$ 部分及 $120 \sim 128 \text{h}$ 部分观察出。此外, 这一波动过程的幅度随血浆中 CoQ_{10} 浓度的增大而变大。

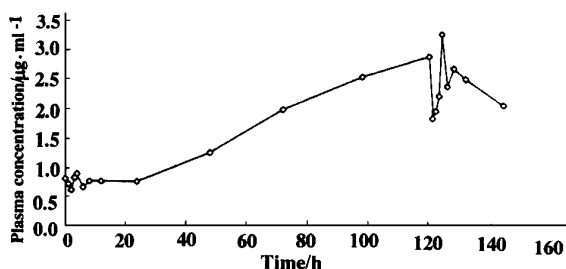


Fig 3 Mean plasma concentration-time curve of CoQ_{10} in the whole period of experiment ($n=8$).

参 考 文 献

- 1 Ernster L. Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q. Vol 1. Amsterdam: Elsevier/ North-Holland, 1977. 15
- 2 Abe K, Katayama K, Ikenoya S, et al. Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q. Vol 3. Amsterdam: Elsevier/ North-Holland, 1981. 53
- 3 Kishi T, Okamoto T, Kanamori N, et al. Biomedical and

- clinical aspects of coenzyme Q. Vol 3. Amsterdam: Elsevier/ North-Holland, 1981. 67
- 4 冈本正志, 高桥京子, 纪氏健雄, 他. エビデカレノン錠のバイオウベリリテイ. 病院药学, 1983, 9: 19
- 5 金森伸, 片冈和二郎, 西井论司, 他. エビデカレノ二制剂の投与剂形の込ハによる人血浆エビキノン値に及ぼす影. 药理学, 1985, 45: 119

DETERMINATION OF COENZYME Q₁₀ AND ITS CONCENTRATION TIME CURVE IN HUMAN PLASMA BY HPLC

Ding Li(Ding L) , Yang Jin(Yang J)¹ , Hua Yaping(Hua YP) , Zhou Wei(Zhou W) ,
Zhang Zhengxing(Zhang ZX) and An Dengkui(An DK)

(*Department of Pharmaceutical Analysis , ¹Research Center of Pharmacokinetics ,
China Pharmaceutical University , Nanjing 210009*)

ABSTRACT **AIM:** To develop an HPLC method for the study of plasma concentration-time curve of coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) in human body. **METHODS:** Chromatography was performed on a Spherisorb C₁₈ column (25 cm × 4.6 mm ID) with ethanol-water-acetic acid (98: 2: 0.7) as mobile phase. The detection wavelength was 275 nm. The internal standard was coenzyme Q₆ (CoQ₆) . After deproteinization with ethanol, the plasma was extracted with n-hexane. **RESULTS:** A good linearity was obtained from 0.2 ~ 4.0 μg • ml⁻¹ of CoQ₁₀ in human plasma with a correlation coefficient of 0.9998. The extraction recovery was more than 90%. The plasma concentration-time curve of CoQ₁₀ of eight volunteers was determined by this method following a controlled clinical experiment. **CONCLUSION:** The established HPLC method was proved to be a good method for the determination of CoQ₁₀ in human plasma. The experimental results showed that the human plasma concentration of endogenous CoQ₁₀ was (763.3 ± 86.3) ng • ml⁻¹ and was affected by food and movement.

KEY WORDS coenzyme Q₁₀; HPLC