

辅酶 Q₁₀血药浓度测定方法学研究

顾敏华 邵青¹ 王彤文¹ 李士敏¹ 栾连军¹ 张勤¹(杭州 310011 浙江万马药业有限公司;¹ 浙江大学药学院)

辅酶 Q₁₀ (Coenzyme Q₁₀) 又名万有醌 - 50 (Ubiquinone - 50), 具有较广泛的生理生化作用, 临床上用于各型肝炎的综合免疫治疗, 亦用于高血压、心脏病、肿瘤的免疫治疗。辅酶 Q₁₀ 血药浓度的测定方法学研究国内未见报道, 作者对其方法学进行研究。以便为辅酶 Q₁₀ 片人体相对生物利用度试验和临床进行血药浓度检测提供实验依据。

1 仪器与试剂

辅酶 Q₁₀ 对照品, 含量为 101.1% (日本产, 由广东中山医药公司提供)。辅酶 Q₁₀ 标准品, 含量为 101.1% (日本产, 由广东中山医药公司提供)。维生素 K₁ (浙江万马药业有限公司), 实验中所用试剂甲醇为色谱纯, 其余均为国产分析纯。WH - 90A 型微型混合器, 岛津 LC - 6A 型高效液相色谱仪, SPD - 6AV 型紫外检测器, C - R4A 色谱数据处理仪。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 色谱柱的选择: 分别选用 C₁₈ 色谱柱, 6.0 × 150mm, 5μm 和 C₈ 色谱柱, 6.0 × 150mm, 5μm, 流动相均为甲醇, 紫外检测波长 275nm, 进行比较, 结果表明: 辅酶 Q₁₀ 在 C₁₈ 色谱柱上的保留时间 40min 以上, 峰形较差, 而在 C₈ 色谱柱上的保留时间为 20min 左右, 色谱峰形对称。

2.1.2 流动相选择: 以 C₈ 色谱柱为分析柱, 柱温保持在 35℃, 分别选用甲醇 - 水 (95:5)、甲醇 - 甲醇 - 异丙醇 (4:1)、甲醇 - 异丙醇 (9:1)、甲醇 - 异丙醇 - 正己烷 - 无水乙醇 (20:1:1:1) 为流动相, 以加有辅酶 Q₁₀ 对照品的血浆为测试样本, 进行各种流动相的比较, 结果表明: 甲醇 - 水 (95:5) 为流动相时, 样品主峰保留时间在 40min 以上, 色谱峰扩散明显, 峰形较宽, 不利于检测灵敏度的提高; 甲醇 - 异丙醇 (4:1)、甲醇 - 异丙醇 (9:1)、甲醇 - 异丙醇 - 正己烷 - 无水乙醇 (20:1:1:1) 为流动相时, 辅酶 Q₁₀ 的保留时间较为合适, 但内标峰 (Vit K₁) 与血浆中的杂质峰分离不完全, 有干扰; 选用甲醇作流动相时, 主峰、内标峰与杂质分离完全, 内标和主峰的保留时间分别为 12 和 20min 左右, 故确定流动相为甲醇。

2.1.3 柱温的选择: 在上述色谱条件下, 分别选择色谱柱温度为 30, 35 和 40℃ 进行比较, 发现 35℃ 时分离结果和保留时间较为满意。

2.1.4 提取方法选择: 由于辅酶 Q₁₀ 脂溶性很大, 血药浓度又较低, 血浆沉淀蛋白后直接进样灵敏度较低, 需先用适当的溶剂提取分离, 经浓缩后进样分析, 选用了以下几种提取分离方法进行比较: ①精密吸取血浆样品 1ml, 加入内标 (Vit K₁) 溶液 100μl, 混匀, 加入甲醇 1ml, 混匀, 再加正己烷 4ml, 振荡提取 3min, 移取上层正

己烷萃取液,样品再加入正己烷 4ml,振荡提取 3min。合并两次正己烷萃取液,冰箱放置 15h 以上,吸取上层正己烷萃取液 6ml 于 10ml 离心试管中,置 40℃ 水浴上通氮气吹干,冷却后加无水乙醇 200 μ l 溶解,吸取 20 μ l 进色谱仪分析。该方法回收率好,灵敏度高,结果可靠。②精密吸取血浆 1ml 加甲醇 1ml,沉淀,加正己烷萃取 2 次,每次 4ml,萃取液过 200mg 硅胶固相萃取柱,用 2ml 正己烷冲洗,再用 0.5ml 甲醇冲洗 2 次,收集冲洗液,过 200mg C₁₈ 色谱固相萃取柱,先用 1.5ml 甲醇冲洗,再加 0.15ml 异丙醇冲洗 2 次,收集冲洗液,进样分析。结果显示血浆色谱杂质峰少,无干扰,但实验操作繁琐,分析成本高。③精密吸取血浆 1ml 加甲醇 1ml,沉淀,加正己烷 6ml 萃取 1 次,精密吸取 5ml 萃取液,吹干,精密加入 0.5ml 甲醇溶解,进样分析。结果回收率较低,且甲醇对辅酶 Q₁₀ 溶解性较差,测定结果的重现性差。④精密吸取血浆 1ml 加甲醇 1ml,沉淀,加正己烷 6ml 萃取 1 次,萃取液吹干,加 0.2ml 无水乙醇溶解,进样分析。结果样品溶解好,但回收率较低。

综上所述,确定的色谱条件为:色谱柱:Shimadzu C₈ 柱,Ø6.0mm × 150mm;流动相:甲醇(色谱纯);流速:1ml/min;柱温:35℃;检测波长:275nm。

2.2 标准曲线制备

精密吸取不同浓度辅酶 Q₁₀ 标准溶液 100 μ l,加蒸馏水 1.0ml,再加入内标(Vit K₁)溶液 100 μ l,混匀,配成一系列不同药物浓度的标准曲线样品,辅酶 Q₁₀ 浓度为 0.20~10.00 μ g/ml。于上述标准曲线样品中精密加入甲醇 1ml,混匀,加正己烷 4ml,振荡提取 3min,移取上层正己烷萃取液,样品再加入正己烷 4ml,振荡提取 3min。合并两次正己烷萃取液,冰箱放置 15h 以上。精密吸取上层正己烷萃取液 6ml 于 10ml 离心试管中,置 40℃ 水浴通氮气吹干,冷却后加无水乙醇 200 μ l 溶解,吸取 20 μ l 进样,得标样色谱图。以上操作过程注意避光。以辅酶 Q₁₀ 峰面积与内标峰面积之比为纵坐标,辅酶 Q₁₀ 浓度为横坐标绘制标准曲线。标准曲线回归方程为 $A_s/A_i = 0.5176c - 0.0073$, $r = 0.9999$,线性范围为 0.20~10.00 μ g/ml。

2.3 专属性试验

精密吸取服药前空白血浆 1ml,自 2.4.1 项下“加入甲醇 1ml,混匀,”起依法操作,其 HPLC 色谱图见图 1。空白血浆中加内标及辅酶 Q₁₀ 标准品的 HPLC 色谱图见图 2,血浆样品 HPLC 色谱图见图 3。

2.4 加样回收率试验

精密吸取空白血浆 1ml,分别制备 15.21,5.07 和 1.01 μ g/ml 3 种浓度的辅酶 Q₁₀ 样品,按标准曲线制备

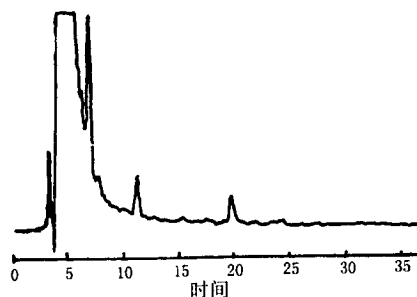


图 1 空白血浆色谱图

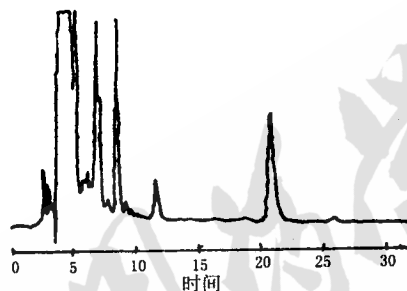


图 2 标准品色谱图

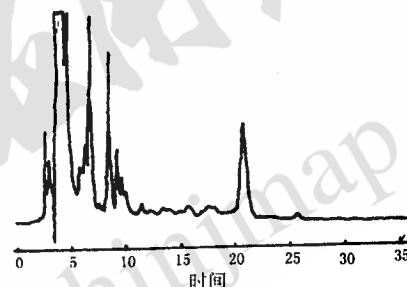


图 3 测试样品色谱图

项下方法操作,测定并记录色谱图。另取空白血浆 1ml 同法操作,测定血浆中内源性辅酶 Q₁₀ 基础值,辅酶 Q₁₀ 峰面积与内标峰面积之比代入标准曲线,计算得辅酶 Q₁₀ 浓度,并计算加样回收率。结果表明,平均加样回收率为 100.1% ± 3.47%。

2.5 精密度试验

精密吸取空白血浆 1ml,分别制备 15.21,5.07 和 1.01 μ g/ml 3 种浓度的辅酶 Q₁₀ 样品,按标准曲线制备项下方法操作,一天内连续测定 5 次,记录色谱图,将辅酶 Q₁₀ 峰面积与内标峰面积之比代入标准曲线中计算其浓度,计算日内相对标准偏差;将制备的高、中、低 3 种浓度的血浆样品测定 5d,记录色谱图,将辅酶 Q₁₀ 峰面积与内标峰面积之比代入标准曲线中计算其浓度,计算日间相对标准偏差,辅酶 Q₁₀ 日内 RSD 小于 2.44%,日间 RSD 小于 6.42%。

2.6 最低检测浓度

配制一系列不同浓度的标样,按标准曲线制备项下操作,以所得色谱峰峰高为基线噪音的 3 倍为最低

检测限。结果表明:辅酶 Q₁₀血浆最低检测浓度为0.10 μg/ml。

3 讨 论

辅酶 Q₁₀为高脂溶性药物,在 C₈ 固定相上保留值较大,需用极性较小的甲醇洗脱,流动相中加入少量的水,其保留时间就大大延长,色谱峰形扩散严重。而且,辅酶 Q₁₀对光不稳定,见光易分解,故在操作过程中

应注意避光,在暗处进行提取纯化,并尽快分析。

参考文献

- 1 张殿清,范崇竹,于波,等.高效液相色谱法测定心肌线粒体辅酶 Q₁₀含量的研究.中国地方病学杂志,1986,5(4): 256.
- 2 胡昌良,李瑶卿,夏冬,等.辅酶 Q₁₀注射液稳定性的研究.中国药学杂志,1990,25(8):466.