

HPLC 法快速测定辅酶 Q₁₀ 维生素 E 软胶囊中 2 种功效成分含量*

林宏琳¹, 华永有¹, 童金华²

(1. 福建省疾病预防控制中心, 福州 350001; 2. 福建农林大学菌草研究所, 福州 350002)

摘要 目的: 建立 HPLC 法同时快速测定辅酶 Q₁₀ 维生素 E 软胶囊中辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 的含量。**方法:** 以无水乙醇为提取溶剂对样品进行超声提取; 选用 Accucore C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 2.6 μm) 色谱柱, 以无水乙醇-甲醇(7:13)为流动相, 流速 0.4 mL · min⁻¹, 柱温 38 °C, 检测波长 280 nm。**结果:** 样品中辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 在 6 min 内得到很好的分离, 质量浓度分别在 0.050~0.502 和 0.100~0.801 mg · mL⁻¹ 范围内呈良好线性($r=0.9999$); 辅酶 Q₁₀ 高、低添加水平的平均回收率($n=3$)分别为 90.6% 和 98.3%, RSD 分别为 2.9% 和 4.0%; 维生素 E 高、低添加水平的平均回收率($n=3$)为 98.9% 和 95.7%, RSD 分别为 3.1% 和 2.6%。3 批样品中辅酶 Q₁₀ 含量分别为 103、102 和 105 mg · g⁻¹, 维生素 E 含量分别为 70.7、71.3 和 71.2 mg · g⁻¹。**结论:** 本文建立的方法经方法学验证, 可用于辅酶 Q₁₀ 维生素 E 软胶囊的质量控制。**关键词:** 辅酶 Q₁₀; 维生素 E; 生育酚; 脂溶性醌类化合物; 抗氧化剂; 脂溶性维生素; 软胶囊; 高效液相色谱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)03-0402-05
doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.03.05

A fast HPLC method for simultaneous determination of two kinds of functional components in coenzyme Q₁₀ vitamin E softgel

LIN Hong-lin¹, HUA Yong-you¹, TONG Jin-hua²

(1. Fujian Center For Disease Control & Prevention, Fuzhou 350001, China;
2. Juncao Research Institute, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract Objective: To establish a fast HPLC method for simultaneous determination of coenzyme Q₁₀ and vitamin E in coenzyme Q₁₀ vitamin E softgel. **Methods:** The sample was extracted by ultrasound with dehydrated alcohol. An Accucore C₁₈ column (150 mm × 2.1 mm, 2.6 μm) was used as stationary phase and alcohol-methanol (7:13) as the mobile phase. The flow rate was 0.4 mL · min⁻¹ and the column temperature was set at 38 °C. The UV detection wavelength was 280 nm. **Results:** Coenzyme Q₁₀ and vitamin E were well separated within 6 minutes. The linear ranges of coenzyme Q₁₀ and vitamin E were 0.050–0.502 and 0.100–0.801 mg · mL⁻¹ ($r=0.9999$), respectively. The recoveries ($n=3$) of coenzyme-Q₁₀ were 90.6% with RSD of 2.9% at high concentration and 98.3% with RSD of 4.0% at low concentration; the recoveries ($n=3$) of vitamin E were 98.9% with RSD of 3.1% at high concentration and 95.7% with RSD of 2.6% at low concentration. The contents of coenzyme Q₁₀ in the three samples were 103, 102 and 105 mg · g⁻¹, respectively; the contents of vitamin E in the three samples were 70.7, 71.3 and 71.2 mg · g⁻¹,

* 福建省医学创新课题(2016-CXB-1)
第一作者 Tel:(0591)87531915; E-mail: erianlin@sina.com

respectively. **Conclusion:** The proposed method has been validated and it can be used for the quality control of coenzyme Q₁₀ and vitamin E softgel.

Keywords: coenzyme Q₁₀; vitamin E; tocopherol; fat-soluble quinone compounds; antioxidants; fat-soluble vitamins; softgel; HPLC

辅酶 Q₁₀ (coenzyme Q₁₀, Co-Q₁₀) 是一种存在于自然界的脂溶性醌类化合物,其结构与维生素 K 相类似。同时,它也是一种优良的抗氧化剂,具有参与呼吸链电子传递^[1],细胞抗氧化^[2-3],阻止细胞凋亡^[4-7],增强免疫力等功能,并且无毒,无致畸作用和无明显副作用,使用安全^[8]。维生素 E 又称为生育酚,其中以 α -生育酚的生物效应最高,具有促进生育和抗衰老的作用,参与细胞 DNA 合成的调节,可提高免疫力和对疾病的抵抗力^[9]。一般情况下在保健食品中添加的是 α -生育酚^[10]或其衍生物。 α -生育酚虽然具有极强的抗氧化性质,但也极易被氧化,在贮藏和运输的过程中易发生变质。天然维生素 E 属于脂溶性维生素,与水溶性有效成分或界面难以均匀混合,不利于消化吸收^[11]。因此,生产中常采用衍生化法, α -生育酚醋酸酯是最常见的维生素 E 酯化衍生物,它除了具有较好的稳定性和储存性、可以作为机体内维生素 E 的前体物质、水解后发挥维生素 E 的功效外,还具有特殊功效如保护视觉神经,保护皮肤,促进溃疡愈合和抗击炎症^[12]等,大大扩展了维生素 E 的应用领域。国内外将辅酶 Q₁₀ 用于营养保健品和食品添加剂时,常与维生素 E 配伍使用^[13],两者的联合作用可提高各自抵抗外界氧化因子损害的能力,并具有协同作用^[14]。

关于辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 的含量测定方法常见的是 HPLC 法,但同时快速测定这 2 个化合物的 HPLC 法鲜有报道。相关文献报道或前处理烦琐,色谱出峰也不理想^[15]或用到 C₃₀ 色谱柱^[16],方法并不通用。本实验通过优化样品的前处理,以超声提取和冷冻离心代替皂化、萃取和浓缩等步骤,改进实验过程的简便性、可操作性及目标物的稳定性;优化色谱条件,缩短分析时间至小于 6 min,建立同时快速测定辅酶 Q₁₀ 维生素 E 软胶囊中辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 这 2 种功效成分含量的 HPLC 方法,为辅酶 Q₁₀ 维生素 E 软胶囊及同类产品的质量控制在提供一种更加便捷高效和绿色环保的新方法。

1 仪器与试药

LC-20 型高效液相色谱仪系统,配 SPD-M20A

型二极管阵列检测器 (SHIMADZU 公司); Millipore Direct-Q 纯水系统 (Millipore 公司); Thermo 公司 Accucore C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 2.6 μ m; 填料: 十八烷基硅烷键合表面多孔实心核颗粒); KQ-250DE 数控超声波清洗器 (昆山市仪器有限公司); Allegra X-30 离心机 (BECKMAN 公司); CPA225D 十万分之一电子天平 (赛多利斯公司)。

辅酶 Q₁₀ 对照品购自中国食品药品检定研究院 (批号 140611-200803, 含量为 100.0%); DL- α 生育酚醋酸酯 (DL-alpha tocopherol acetate) 对照品, LOT NO. LC17386V, 98.9%, SUPELCO 公司; DL- α 生育酚 (DL-alpha tocopherol) 对照品, LOT NO. LB91772V, 99.9%, 美国 SUPELCO 公司。

甲醇为色谱纯,无水乙醇为优级纯,试验用水为纯净水。

样品辅酶 Q₁₀ 维生素 E 软胶囊 (400 mg · 粒⁻¹) 由广州渔夫堡医药科技有限公司提供,批号为 20151110、20151111、20151112。

2 溶液的制备

2.1 对照品储备液 确称取对照品 (按纯度标示折算) 辅酶 Q₁₀ 25.11 mg、DL- α 生育酚醋酸酯 40.05 mg 及 DL- α 生育酚 20.20 mg, 分别置于 25 mL 量瓶中,以无水乙醇溶解并定容至刻度,制成辅酶 Q₁₀ 1.004 mg · mL⁻¹、DL- α 生育酚醋酸酯 1.602 mg · mL⁻¹ 及 DL- α 生育酚 0.808 mg · mL⁻¹ 的单一成分的对照品储备液。-18 °C 以下储存,备用。

2.2 系列混合对照品溶液 分别吸取上述 2 种对照品储备液各 5.00 mL 于 10 mL 量瓶中,制成辅酶 Q₁₀ 0.502 mg · mL⁻¹ 和 DL- α 生育酚醋酸酯 0.801 mg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液; 分别精密量取混合对照品溶液适量,置于 10 mL 量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,混匀,得辅酶 Q₁₀ 质量浓度分别为 0、0.063、0.126、0.251、0.502 mg · mL⁻¹, DL- α 生育酚醋酸酯质量浓度分别为 0、0.100、0.200、0.400、0.801 mg · mL⁻¹ 的系列混合对照品溶液。

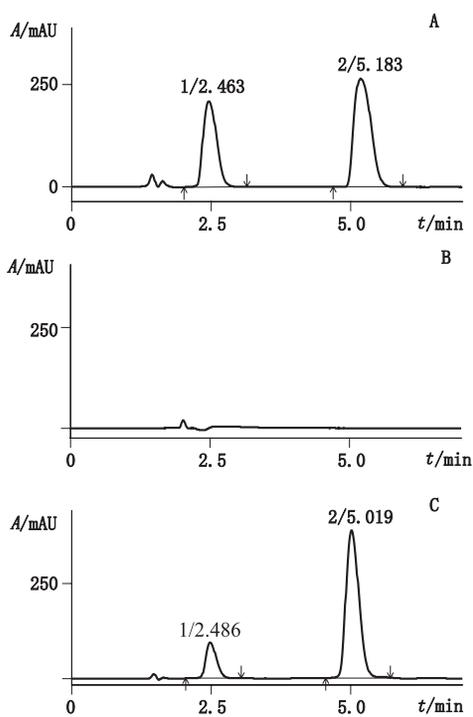
2.3 供试品溶液 精密称取辅酶 Q₁₀ 维生素 E 软胶

囊内容物约 0.1 g 于 50 mL 离心管中,准确加无水乙醇 25 mL,超声(500 W, 40 kHz, 50 °C)提取 2 min,放冷,于 -18 °C 以下冷冻 2 h,取出后 8 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液过 0.22 μm 有机滤膜,即得。全程避光操作。

2.4 空白样品溶液 取无水乙醇,按“2.1.3”项不加样品进行操作,即得空白样品溶液。

3 色谱条件

色谱柱: Accucore C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 2.6 μm); 流动相: 乙醇-甲醇(7:13); 流速: 0.4 mL·min⁻¹; 柱温: 38 °C; 检测波长: 280 nm; 进样量: 5 μL。在上述色谱条件下,辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 的分离度均大于 1.5,理论板数均大于 1 000,色谱图见图 1。



1. 维生素 E (vitamin E) 2. 辅酶 Q₁₀ (coenzyme Q₁₀)

图 1 空白样品溶液 (B)、混合对照品溶液 (A) 及供试品溶液 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank sample solution (B), mixed reference substances solution (A) and sample solution (C)

4 方法学验证

4.1 线性关系考察及检测限测定 取“2.1.2”项下系列混合对照品溶液进样分析,以质量浓度 X 和对应的峰面积 Y 进行线性回归,辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 质量浓度分别在 0.063~0.502 和 0.100~0.801 mg·mL⁻¹ 范围内呈良好线性,回归方程:

$$Y=1.194 \times 10^7 X-9.461 \times 10^3 \quad r=0.9999$$

$$Y=3.784 \times 10^6 X-1.316 \times 10^4 \quad r=0.9999$$

将低浓度的混合对照品溶液以流动相逐级稀释后进样 20 μL 测定,当 $S/N=3$ 时,辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 的检测限分别为 1 和 3 μg·mL⁻¹。

4.2 精密度试验 取同一混合对照品溶液连续进样 6 次,结果辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 峰面积的 RSD 分别为 2.29% 和 1.67%,表明仪器精密度良好。

4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,置于仪器自动进样器内(室温暗处),分别于 0、4、8、12、24 h 分析测定,结果辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 峰面积的 RSD 分别为 3.30% 和 2.78%,表明供试品溶液在室温暗处 24 h 内稳定性良好。

4.4 回收率和重复性试验 选取同一胶囊样品内容物约 0.05 g,共 6 份,分别加入对照品储备液各 2、4 mL,每个添加水平 3 份,分别按“2.1.3”项方法制备供试溶液,进样测定。结果辅酶 Q₁₀ 在高、低水平的添加回收率分别为 90.6% 和 98.3%,RSD 分别为 2.9% 和 4.0%,维生素 E 在高、低水平的添加回收率分别为 98.9% 和 95.7%,RSD 分别为 3.1% 和 2.6%。表明该方法准确度、重复性良好。

5 样品测定

取 3 批次的样品各 3 份,分别按本法与国标法 [GB/T 5009.82—2003(维生素 E)] 进行平行测定,以外标法计算含量,结果见表 1。

表 1 3 批样品中辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 含量 (mg·g⁻¹, n=3)

Tab. 1 Contents of coenzyme Q₁₀ and vitamin E in 3 samples

批号 (lot No.)	本法 (the method)			国标法 (national standard method) α-生育酚 (α-tocopherol)
	辅酶 Q ₁₀ (coenzyme Q ₁₀)	α-生育酚 醋酸酯 (α-tocopherol acetate)	折算成 α- 生育酚 (converted into α-tocopherol)	
20151110	103	77.6	70.7	69.3
20151111	102	78.3	71.3	69.8
20151112	105	78.2	71.2	69.9

6 讨论

6.1 样品提取方法的选择 关于维生素 E 测定方法的现行国家标准^[17-18]适用于天然食品中的维生素 E,都需要将不同构型的维生素 E 经皂化转化为生育酚的形式,但预处理操作烦琐、费时,方法回收率低。考虑保健食品基质相对简单,维生素含量高,且构型较为单一,多以醋酸酯等添加剂的形式存在,本文参

考中国药典^[19]、美国药典^[20]、日本药典^[21] 辅酶 Q₁₀ 测定的提取方法,即都是以无水乙醇溶解于 50 ℃ 提取,再优化样品的预处理过程,以超声提取和冷冻离心去除杂质,使样品中辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 均获得较高的提取效率。考察样品在 2 种不同提取方式下的维生素 E 提取效率,即按照国标法与本文“2.1.3”项下的超声提取法分别制备供试品溶液 3 批次各 3 份,分别按国标法与本法进样分析,计算 α-生育酚含量平均值,结果见表 1。可见,本法与国标法的测定结果非常接近,国标法结果略低于本法。国标法的试样处理需经过皂化、提取、洗涤、浓缩等步骤,易使目标物损失,以致结果偏低,而本法采用超声提取和冷冻离心除杂,并不损失目标物,结果更加准确。且超声提取法操作明显简便、快速,又节约溶剂、人力,适用性强,可推广使用。

6.2 流动相的选择 因为辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 的极性都非常小,采用纯甲醇作为流动相时,维生素 E 可出峰但辅酶 Q₁₀ 不出峰。辅酶 Q₁₀ 微溶于乙醇,因此在流动相的甲醇中加入适量无水乙醇可使辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 都出峰,并且随着乙醇的比例增大,辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 的保留时间逐渐缩短。中国、美国、日本的药典^[19-21] 关于辅酶 Q₁₀ 的测定方法就是采用不同比例的无水乙醇-甲醇作为流动相。本文条件下当流动相中乙醇比例达到 35% 时,样品中的辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 能够得到有效的分离(见图 1),故选择无水乙醇-甲醇(7:13)为流动相。另外,乙醇比甲醇毒性更低,沸点更高,挥发性更低,更加绿色环保,可以放心使用。

6.3 色谱柱的选择 分别考察了 DIONEX 公司 Acclaim 120 C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱、Welch 公司 Xtimate C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱与 Thermo 公司 Accucore C₁₈(150 mm × 2.1 mm, 2.6 μm) 色谱柱,发现它们对目标组分均能很好分离,只是各色谱峰的保留时间有所差异。使用普通 C₁₈ 柱需增加无水乙醇的比例,流动相乙醇-甲醇比例调至 13:7,都能获得满足分析要求的色谱图。而具有表面多孔增强核技术的 Accucore C₁₈ 柱,采用乙醇-甲醇(7:13)即可获得满意的保留时间及峰形,在更短的时间(<6 min)实现优异的分离,柱效更高,灵敏度更高,并节约溶剂成本。因此,本文采用 Accucore C₁₈ 柱进行实验。实际应用中,也可以根据实验室条件选择常用的 C₁₈ 柱。

6.4 柱温的选择 流动相中的无水乙醇具有较强的洗脱能力,但其粘度较大,在 25 ℃ 的粘度是甲醇的 2 倍,上色谱柱后柱压明显增大,限制了它在 HPLC 中的使用。实验证明,在一般情况下,适当升高柱温可明显降低柱压。在本实验条件下,当柱温升到 38 ℃ 左右,可忽略柱压的影响。故柱温选择 38 ℃。

6.5 检测波长的选择 检测波长的选择应从分析方法的灵敏度和专属性两方面考虑。分别取辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 的混合对照品溶液及空白样品溶液进样,从二极管阵列检测器的扫描图上可以看出辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 的最大吸收波长分别在 275 和 284 nm 处,空白样品溶液在 275~284 nm 处没有紫外吸收。而保健食品中辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 的含量较高,即使不在其最大吸收波长处测定,仍能保证结果的准确度和精密度。因此本文根据具体情况,将 280 nm 作为辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 共同的检测波长,而不使用分段波长,增强本法的适应性。

6.6 小结 本文建立的 HPLC 法可同时快速测定辅酶 Q₁₀ 维生素 E 软胶囊中辅酶 Q₁₀ 和维生素 E 的含量,样品前处理简单高效,方法简便快速,经济环保,重复性好,准确度高,适应性强,为辅酶 Q₁₀ 维生素 E 类保健食品的全面质量控制提供一种新的方法。

参考文献

- [1] MITCHELL P. Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c₁ complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle[J]. *FEBS Lett*, 1975, 56(1): 1
- [2] JAMES AM, SMITH RA J, MURPHY MP. Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial coenzyme Q [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 423(1): 47
- [3] FREI B, KIM MC, AMES BN. Ubiquinol-10 is an effective lipid soluble antioxidant at physiological concentrations[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(12): 4879
- [4] ROSARIO B, TITO F, LAURA P, *et al.* Concomitant effect of topical ubiquinone Q₁₀ and vitamin E to prevent keratocyte apoptosis after eximer laser photoablation in rabbits[J]. *J Refrac Surg*, 2002, 18(2): 135
- [5] KOONCUMCHOO P, SHARMA S, PORTER J, *et al.* Coenzyme Q₁₀ provides neuroprotection in iron-induced apoptosis in dopaminergic neurons[J]. *J Mol Neurosci*, 2005, 28(2): 125
- [6] CHEN CC, LIOU SW, CHEN CC, *et al.* Coenzyme Q₁₀ reduces ethanol induced apoptosis in corneal fibroblasts[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): 1
- [7] PAPUCCI L, SCHIAVONE N, WITORT E, *et al.* Coenzyme Q₁₀ prevent apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization

- independently of its free radical scavenging property [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(30): 28220
- [8] 王虹玲,武婷茹,战秀梅. 辅酶 Q₁₀ 抗氧化性及应用研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2015(19): 188
WANG HL, WU TR, ZHAN XM. Recent advance on antioxidant and application of coenzyme Q₁₀[J]. *Food Res Dev*, 2015(19): 188
- [9] ZINGG JM. Vitamin E: an overview of major research directions [J]. *Mol Aspects Med*, 2007, 28(5): 400
- [10] 杨大进,方从容,王竹天,等. 进口保健食品中维生素检测方法现状及展望[J]. *中国食品卫生杂志*, 2004(1): 62
YANG DJ, FANG CR, WANG ZT. *et al.* Methods for determination of vitamins in import health foods—the current situation and prospect [J]. *Chin J Food Hyg*, 2004(1): 62
- [11] TRABER MG, ATKINSON J. Vitamin E, antioxidant and nothing more [J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43(1): 4
- [12] TRABER MG, Elsner A, Brigelius-Flohé R. Synthetic as compared with natural vitamin E is preferentially excreted as α -CEHC in human urine: studies using deuterated α -tocopheryl acetates [J]. *FEBS Lett*, 1998, 437(1-2): 145
- [13] 李羽,梁艺英,冯晓文. 辅酶 Q₁₀ 与维生素 E 配伍的使用安全性探讨[J]. *现代食品科技*, 2012, 28(1): 108
LI Y, LIANG YY, FENG XW. The edible safety of combined use of Coenzyme Q₁₀ and Vitamin E [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2012, 28(1): 108
- [14] 孙艳妮,刘建利,邢连喜,等. 维生素 E 和辅酶 Q₁₀ 相互作用研究 [J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(6): 1118
SUN YN, LIU JL, XING LX, *et al.* Study the interaction between vitamin E and coenzyme Q₁₀ [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2010, 30(6): 1118
- [15] KARPIŃSKA J, MIKOŁUĆ B, MOTKOWSKI R, *et al.* HPLC method for simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and coenzyme Q₁₀ in human plasma [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 42(2): 232
- [16] GLEIZE B, STEIB M, ANDRÉ M, *et al.* Simple and fast HPLC method for simultaneous determination of retinol, tocopherols, coenzyme Q(10) and carotenoids in complex samples [J]. *Food Chem*, 2012, 134(4): 2560
- [17] GB/T 5009.82-2003 食品中维生素 A 和维生素 E 的测定 [S]. 2003
GB/T 5009.82-2003 Determination of Retinol and Tocopherol in Foods [S]. 2003
- [18] GB 5413.9-2010 食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中维生素 A、D、E 的测定 [S]. 2010
GB 5413.9-2010 Determination of vitamin A, D, E in foods for infants and young children, milk and milk products according to the National Food Safety Standard [S]. 2010
- [19] 中国药典 2015 年版. 二部 [S]. 2015: 1218
ChP 2015. Vol II [S]. 2015: 1218
- [20] USP 35-NF 30 [S]. 2012: 1460
- [21] JP XVI [S]. 2011: 1548

(本文于 2016 年 3 月 16 日收到)