

粟酒裂殖酵母中辅酶 Q<sub>10</sub>的提取和测定方法

邱卫华 刘 萍 钟桂芳 孙君社

(中国农业大学食品科学与营养工程学院,北京,100083)

**摘 要** 通过对高效液相色谱法测定辅酶 Q<sub>10</sub>与紫外分光光度法测定辅酶 Q<sub>10</sub>的比较,确定了两者的相关性,确定利用紫外分光光度法代替高效液相色谱法测定辅酶 Q<sub>10</sub>,从而简化辅酶 Q<sub>10</sub>的测定方法;通过对醇碱皂化法和碱皂化法提取辅酶 Q<sub>10</sub>的比较,确定利用碱皂化法提取发酵液中的辅酶 Q<sub>10</sub>,并进一步优化了碱皂化法的提取工艺。

**关键词** 辅酶 Q<sub>10</sub>, 测定, 醇碱皂化法, 碱皂化法

辅酶 Q<sub>10</sub>又称泛醌、癸烯醌,它的化学结构为 6 位碳上连有一个 10 单位异戊二烯侧链的 2,3-二甲氧基-5-甲基-1,4-苯醌衍生物<sup>[1]</sup>。以极低的含量广泛存在于动物、植物、微生物等细胞内,并能在所有的机体组织合成。辅酶 Q<sub>10</sub>在脏器(心脏、肝脏、肾脏)、牛肉豆油、沙丁鱼、鲭鱼和花生等食物中含量相对较高,摄入 0.45 kg 沙丁鱼、0.91 kg 牛肉或 1.13 kg 花生可分别提供约 30 mg 的辅酶 Q<sub>10</sub><sup>[2]</sup>。辅酶 Q<sub>10</sub>是一种脂溶性天然维生素类物质,在生物体内起递氢体的作用<sup>[3]</sup>,辅酶 Q<sub>10</sub>作为细胞代谢的激活剂和天然抗氧化剂在心血管疾病的治疗中起着重要作用,并可提高人体免疫力,所以广泛运用于治疗人体免疫系统疾病<sup>[4~7]</sup>。因此辅酶 Q<sub>10</sub>作为具有医学价值的重要生化药物、保健食品的良好材料或化妆品的原料,越来越受到人们的关注。

利用微生物发酵法生产辅酶 Q<sub>10</sub>,具有原料来源丰富、成本低、反应条件温和、易控制等许多优点,可实现工业规模生产<sup>[8]</sup>。迄今为止,国内外报道的辅酶 Q<sub>10</sub>生产菌株<sup>[7~9]</sup>主要为细菌如假单菌胞属、土壤杆菌属、红极毛杆菌、脱氮极毛杆菌、氢极毛杆菌等,还有象甲烷微环菌、脱氮副球菌、光合细菌等;其次是酵母菌属如假丝酵母、尚德尔酒香酵母、隐球酵母等;另外还有霉菌的报道。大多数生产菌发酵后的产物非常复杂,给辅酶 Q<sub>10</sub>的提取纯化带

来很大困难。本文选用粟酒裂殖酵母生产辅酶 Q<sub>10</sub>,主要研究了发酵液中辅酶 Q<sub>10</sub>的提取工艺和测定方法,为提高辅酶 Q<sub>10</sub>的产量、简化辅酶 Q<sub>10</sub>的测定方法奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌 种

粟酒裂殖酵母 *S. prob* 2. 1794 (*Schizosaccharomyces prob*),购于中国科学院微生物所。

### 1.2 培养基

斜面 and 种子培养基(PYG 培养基)(g/L):葡萄糖 10,酵母膏 3.0,蛋白胨 3.5,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0,蒸馏水 1 L,自然 pH。种子培养基中加入 2%琼脂即为斜面培养基。

发酵培养基(g/L):葡萄糖 20,蔗糖 20,酵母膏 7.5,蛋白胨 7.5,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0,MgSO<sub>4</sub> 0.5,蒸馏水 1 L,自然 pH。

### 1.3 酵母细胞壁破碎方法

细胞培养到对数生长后期以 6 500 r/min 离心收集菌体,用蒸馏水洗涤 2~3 次后,蒸馏水浸泡 48 h。称取一定量浸泡的酵母细胞,以液固体积质量比 2:1 悬浮于 pH 7.4 的磷酸钾缓冲溶液中 30 min,加入 0.15%的 β-巯基乙醇作用 2 h 后,加入 1%纤维素酶作用 3 h,超声波破碎细胞。超声波破碎细胞条件为:超声功率

第一作者:硕士研究生(孙君社教授为通讯作者)。

收稿时间:2004-05-14

500~600 W, 超声 5 s, 间隙 6 s, 超声 30 次。

#### 1.4 辅酶 Q<sub>10</sub>提取方法

##### 1.4.1 醇碱皂化提取 CoQ<sub>10</sub>

将预处理后的菌体移入圆底蒸馏瓶中, 加入质量分数为 7% 的焦性没食子酸, 搅拌均匀, 再缓慢加入 1.3~1.5 倍体积的氢氧化钠-乙醇溶液搅拌, 此时菌体变成黑色糊状, 再加入正己烷进行回流提取, 迅速冷却至室温。用适量石油醚多次萃取, 萃取液用水洗至中性, 再以无水硫酸钠除去水分, 浓缩至小体积, 真空浓缩旋转蒸发除去有机溶剂, 用无水乙醇溶解, 冷析, 待测。

##### 1.4.2 碱皂化提取 CoQ<sub>10</sub>

称取一定量预处理后的菌体移入圆底蒸馏瓶中, 加入 30 mL 酸性水, 搅匀, 在 90℃ 加热回流 3 h 后, 缓慢加入 1.3~1.5 倍体积的 NaOH, 再于 90℃ 水浴锅中回流一定时间, 迅速冷却至室温, 加入 50 mL 有机溶剂浸提 2~3 次, 静置分层, 取上清液, 去离子水洗至中性, 以无水硫酸钠脱水至澄清, 真空旋转蒸发浓缩, 再用 5 mL 无水乙醇溶解, 即得 CoQ<sub>10</sub> 的抽提液。置于 4℃ 冰箱中, 冷析除去胆固醇等杂质, 过滤后待测。

#### 1.5 辅酶 Q<sub>10</sub>的测定

##### 1.5.1 高效液相色谱法测定 CoQ<sub>10</sub>含量

参照参考文献[10]略有改动。色谱条件为: 色谱柱为 150 mm×4.6 mm, 直径为 5 μm 的 Spherisorb C<sub>18</sub> 柱, 流动相为无水 V(乙醇): V(水)(98:2), 流速为 1 mL/min, 检测波长为 275 nm, 进样量为 20 μL, 柱温控制在 22~23℃。

##### 1.5.2 紫外分光光度法测定 CoQ<sub>10</sub>含量

参照参考文献[7]略有改动。将辅酶 Q<sub>10</sub> 粗提液在 275 nm 波长下测定氧化型 CoQ<sub>10</sub> 的吸光度 (A<sub>1</sub>); 然后加入 0.1 mL 0.7% 的硼氢化钠水溶液充分还原 CoQ<sub>10</sub>, 测出其吸光度 (A<sub>2</sub>), 以无水乙醇为对照, 按以下公式计算 CoQ<sub>10</sub> 的含量:

$$\text{CoQ}_{10} \text{ 含量 (mg/L)} = \frac{(A_1 - A_2) \times n \times 10^6}{142 \times S} \times W$$

(32)

式中  $n$  为稀释倍数,  $S$  为细胞干重 (g),  $W$  为每升培养液所含的细胞干重 (g/L), 142 为 1% 的 CoQ<sub>10</sub> 乙醇溶液, 在 275 nm 波长下氧化型和还原型吸光度之差。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵提取液中辅酶 Q<sub>10</sub>测定方法的确定

分别用 HPLC 和紫外分光光度法测定发酵提取液中的辅酶 Q<sub>10</sub>, 将两者的测定值进行比较确定 2 种测定方法之间的相关性, 结果见图 1。由于发酵细胞提取液中含有一定量的杂质, 在波长 275 nm 处可能会干扰紫外分光光度法测定的结果, 由图 1 可知, 利用紫外分光光度法和高效液相色谱法测定 CoQ<sub>10</sub> 具有良好的相关性, 其线性方程为:  $Y = 0.9748X + 0.2205$ , 相关系数  $R^2 = 0.9993$ , 从而在一定程度上可以用紫外分光光度法来代替高效液相色谱法测定 CoQ<sub>10</sub> 的含量。但是用紫外分光光度法测定得辅酶 Q<sub>10</sub> 的值比高效液相色谱法测定辅酶 Q<sub>10</sub> 的含量偏高, 可能是因为发酵提取液中某些杂质的影响。所以在以后的生产中可以利用紫外分光光度法来代替高效液相色谱法测定辅酶 Q<sub>10</sub>, 从而简化了辅酶 Q<sub>10</sub> 的测定方法, 同时也节约了成本。

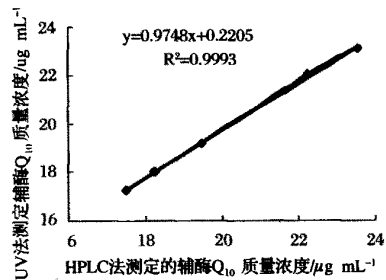


图 1 UV 与 HPLC 测定细胞提取液中 CoQ<sub>10</sub> 含量的相关性

### 2.2 辅酶 Q<sub>10</sub>提取方法的比较

按照 1.4 中的 2 种方法提取的辅酶 Q<sub>10</sub>, 利用 HPLC 法测定从发酵细胞中提取的辅酶 Q<sub>10</sub> 溶液, 得到的色谱图见图 2, 图 3 和图 4。由图 2 可知辅酶 Q<sub>10</sub> 标准品的保留时间在 12.059 min, 图 3, 图 4 表示用醇碱皂化法和碱皂化法

提取的辅酶 Q<sub>10</sub>粗品的 HPLC 色谱图,从图 3 和图 4 可以看出在 12 min 左右样品均出现明显峰,该峰与标准辅酶 Q<sub>10</sub>的保留时间相同,认为在适宜于辅酶 Q<sub>10</sub>提取条件下获得的粗品中主要物质是与辅酶 Q<sub>10</sub>标准品相同的物质。

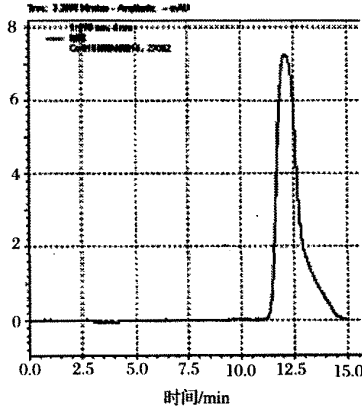


图 2 CoQ<sub>10</sub>标准品 HPLC 色谱图

比较图 3 和图 4 可以看出,利用碱皂化法提取辅酶 Q<sub>10</sub>要比醇碱皂化法取得辅酶 Q<sub>10</sub>杂质少,且用碱皂化法提取得到的辅酶 Q<sub>10</sub>含量也比用醇碱皂化法提取的辅酶 Q<sub>10</sub>含量要高。由峰面积计算得到利用碱皂化法提取得到的辅酶 Q<sub>10</sub>的产量为 24.859 mg/L,而用醇碱皂化法提取时,杂质峰较多,且产量低于碱皂化提取法,由峰面积计算得到利用醇碱皂化法提取得到 CoQ<sub>10</sub>的产量为 18.623 mg/L。这可能是因为醇碱皂化法提取时,由于乙醇的存在,长时间的造化导致 CoQ<sub>10</sub>环上甲氧基与乙醇中的乙氧基换位,生成单或双氧基衍生物,而利用碱-水皂化时 CoQ<sub>10</sub>不被破坏,这可能是因为因为在碱皂化时,皂化是在没有溶剂的条件下悬浮状态下进行的,所以 CoQ<sub>10</sub>被抑制<sup>[11]</sup>。并且利用碱皂化法提取 CoQ<sub>10</sub>,可以省去焦性没食子酸这类昂贵的药品。所以经过实验比较最后确定采用碱皂化法提取发酵菌体中的辅酶 Q<sub>10</sub>。

2.3 碱皂化法提取 CoQ<sub>10</sub>工艺的研究

2.3.1 酸性水 pH 值对浸提效果的影响

准确称取 7 份菌体,每份 2.00 g,待菌体移入圆底蒸馏瓶中后,加入 30 mL pH 值为 2.0,

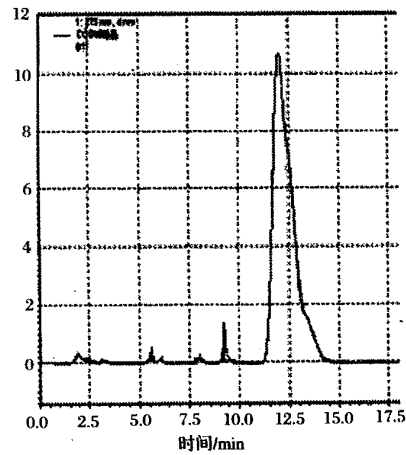


图 3 碱皂化法提取 CoQ<sub>10</sub>粗品 HPLC 色谱

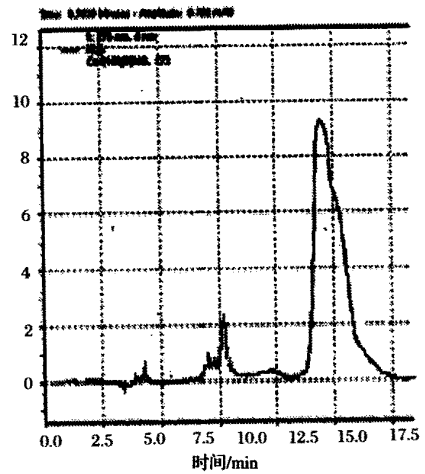


图 4 醇碱皂化法提取辅酶 Q<sub>10</sub>HPLC 色谱图

2.5,3.0,3.5,4.0,4.5,5.0 的酸性水,分别按照 1.4.2 的提取工艺进行 CoQ<sub>10</sub>的提取,浸提结果如图 5 所示。结果表明,酸性水的 pH 值 3.5 时浸提效果最好,CoQ<sub>10</sub>的产率可以达到 24.3 mg/L,pH 值进一步提高对 CoQ<sub>10</sub>的产率影响不大。

2.3.2 有机溶剂对浸提效果的影响

根据溶剂极性不同选择石油醚,丙酮,正己烷,甲醇,异丙醇,氯仿进行浸提。准确称取 6 份菌体,每份 2.00 g,分别按照 1.4.2 的提取工艺进行 CoQ<sub>10</sub>的提取,浸提结果如图 6 所示。在各种萃取剂中,以正己烷浸提效果最好,CoQ<sub>10</sub>的产率可以达到 23.86 mg/L,石油醚略

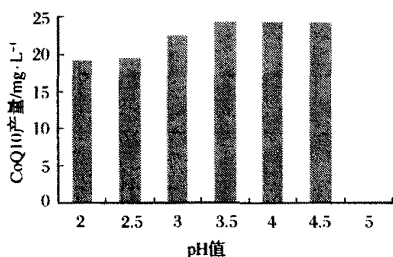


图5 酸性水 pH 值对 CoQ<sub>10</sub> 的提取效果的影响

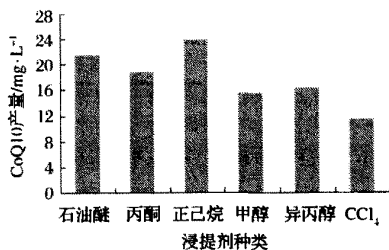


图6 不同溶剂浸提对 CoQ<sub>10</sub> 的提取效果

低于正己烷达到 21.38 mg/L, 故试验中选用正己烷作为萃取剂。

### 2.3.3 浸提温度对浸提效果的影响

准确称取 7 份菌体, 每份 2.00 g, 加入 NaOH 后, 以 60, 70, 80, 90, 100, 110℃ 和 120℃ 的不同温度进行回流, 回流时间定为 30 min, 然后按照 1.4.2 中的提取方法进行 CoQ<sub>10</sub> 的浸提, 实验结果见图 7。

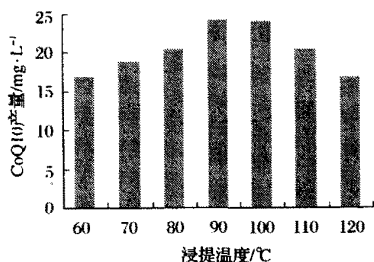


图7 浸提温度对 CoQ<sub>10</sub> 的提取效果

由图 7 可以看出, 在 90℃ 以下, CoQ<sub>10</sub> 的产率随着浸提温度的升高而显著增长, 90℃ 时 CoQ<sub>10</sub> 的产率可以达到 24.05 mg/L。但是超过 90℃ 后, CoQ<sub>10</sub> 的产率不断减少, 这可能是因为温度过高, 造成辅酶 Q<sub>10</sub> 发生了氧化或者加成反应而被破坏<sup>[11]</sup>, 100℃ 以上 CoQ<sub>10</sub> 的产率减

少至 16.53 mg/L, 减少了约 31% 左右。因此选择皂化温度为 90℃。

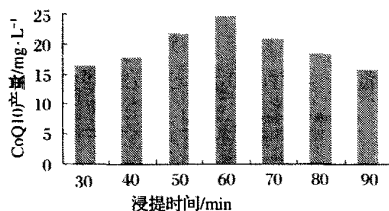


图8 浸提时间对 CoQ<sub>10</sub> 的提取效果

### 2.3.4 浸提时间对提取效果的影响

准确称取 7 份菌体, 每份 2.00 g, 加入 NaOH 后, 以 90℃ 在水浴锅中进行不同时间的回流, 回流时间定为 30, 40, 50, 60, 70, 80 和 90 min, 然后按照 1.4.2 中的提取方法进行 CoQ<sub>10</sub> 的浸提, 实验结果见图 8。

浸提时间为 60 min 时, CoQ<sub>10</sub> 的产率可以达到 24.56 mg/L。但是浸提时间过长时 CoQ<sub>10</sub> 的产率显著降低, 可能是因为长时间皂化导致 CoQ<sub>10</sub> 生成单或双氧基衍生物等杂质, 浸提时间为 90 min 时, CoQ<sub>10</sub> 的产量降为 15.46 mg/L。

## 3 小 结

(1) 利用 HPLC 和紫外分光光度法测定 CoQ<sub>10</sub>, 证实了 2 种方法之间存在线性相关性。从而可以利用紫外分光光度法来代替 HPLC 法测定 CoQ<sub>10</sub> 的含量, 在一定程度上简化了 CoQ<sub>10</sub> 的测定方法, 为实现 CoQ<sub>10</sub> 的工业化生产奠定了基础。

(2) 通过对 CoQ<sub>10</sub> 的提取方法: 醇碱皂化法和碱皂化法的比较, 确定了 CoQ<sub>10</sub> 的最佳提取工艺即碱皂化法。从而节省了焦性没食子酸等昂贵药品的使用, 节约了成本。

(3) 通过实验确定了碱皂化法的最佳条件: 即以 pH 为 3.5 的酸性水预处理菌体, 在 NaOH 溶液中以 90℃ 皂化 60 min, 迅速冷却至室温, 然后加入 50mL 正己烷浸提, 萃取 2~3 次。

以优化后的方法提取 CoQ<sub>10</sub>, CoQ<sub>10</sub> 的产量达到 24.56 mg/L, 比优化之前提高了 33.7%。通过文中实验确定的提取工艺路线大大减少了

提取测定的成本,同时也在一定程度上简化了操作的步骤。

#### 参 考 文 献

- 1 吴祖芳,翁佩芳,陈 坚. 辅酶 Q<sub>10</sub>的功能研究进展[J]. 宁波大学学报(理工版), 2001, 14 (2): 85~88
- 2 康起亮,穆 红,徐风彩. 从烟草悬浮细胞制备辅酶 Q<sub>10</sub>的初步研究[J]. 华南农业大学学报, 1999, 20 (4): 59~64
- 3 Beal M F, Matthews R T. Coenzyme Q<sub>10</sub> in the central nervous system and its potential usefulness in the treatment of neurodegenerative diseases[J]. Mol Aspects Med, 1997, 18: 169~179
- 4 Greenberg S, Frishman W H. Coenzyme Q<sub>10</sub>: New drug for disease[J]. Chin Pharm, 1990, 30: 596~

608

- 5 Lockwood K, Mosegarard S, Wuzu-fu. Apparent partial remission of breast cancer in high risk[J]. Mol Aspects Med, 1994(15): 231~240
- 6 Pepping J. Coenzyme Q<sub>10</sub> [J]. Arn J Health-syst Pharm, 1999: 519~521
- 7 王宗德,曾卫明. 辅酶 Q<sub>10</sub>提取分离和测定的研究现状[J]. 江西林业科技, 1999(4): 21~24
- 8 B.施特尔马赫著,钱嘉渊译. 酶的测定[M]. 上海: 上海科学出版社, 1986. 254~255
- 9 王春林. 中国大豆辅酶 Q<sub>10</sub>的提取、分离和鉴定[J]. 中国医药工业杂志, 1996, 27(3): 102~104
- 10 闫花丽,丁 黎,赵陆华. 高效液相色谱法测定辅酶 Q<sub>10</sub>制剂的含量[J]. 中国生化药物杂志, 1999, 20(6): 305~307
- 11 袁 艺. 猪心中提取和纯化辅酶 Q<sub>10</sub>(联产 CytC)[J]. 安徽农业大学学报, 1997, 24 (2): 200~203

## Extraction and Mensuration of CoQ<sub>10</sub> in *Schizosaccharomyces promb*

Qiu Weihua Liu Ping Zhong Guifang Sun Junshe

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agriculture University, Beijing, 100083)

**ABSTRACT** The extraction and mensuration of CoQ<sub>10</sub> from *Schizosaccharomyces promb* 2.1794 were studies in this paper. Through experiments we established the optimal extraction techniques. HPLC and UV method were used to mensurate the content of CoQ<sub>10</sub> in the culture. By comparing the methods of HPLC and UV, it was determined that UV could replace HPLC in measuring the content of CoQ<sub>10</sub> to a certain extent.

**Key words** coenzyme Q<sub>10</sub>, mensuration, cell fragmentation, extraction

信  
息  
窗

### 仪器信息网“耗材配件”栏目开通

由中国分析测试协会主办,中国仪器仪表学会分析仪器学会协办,仪器信息网([www.instrument.com.cn](http://www.instrument.com.cn))承办的网上仪器展览([www.netshow.com.cn](http://www.netshow.com.cn))近日专门开通了“耗材配件”栏目,以方便广大仪器用户更便捷地查找到自己所需要的仪器零配件、耗材、试剂、玻璃仪器的最新价格行情及供应商信息。目前已有数十家国内外仪器厂商在该栏目展出了6000多个产品(包含产品图片、文字介绍、价格,是否现货,是否促销等信息)。

“耗材/配件”栏目目前按仪器的种类分玻璃仪器、常用物品、化学试剂、色谱仪配件、光谱仪配件、质谱仪配件等31个大类,200多个小类。

欢迎大家访问: <http://www.instrument.com.cn> /quotation,欢迎大家提出宝贵意见,也欢迎耗材配件的生产供应商能够借助此栏目以展示其相关产品,以便大家采购。

详情请咨询本网客服部,客服热线: 010-88424409, 010-88421638