

文章编号:1009-038X(2003)02-0059-04

发酵菌体中辅酶 Q_{10} 的提取及其测定方法

王根华, 钱和*, 肖刚

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 利用紫外分光光度法研究并确定了从发酵菌体中提取辅酶 Q_{10} 的工艺条件, 即 90 ℃ 回流 30 min 和石油醚萃取等, 结果表明, 采用皂化法提取、紫外分光光度法测定发酵菌体中辅酶 Q_{10} 含量, 不但具有较好的重现性和稳定性, 而且其平均回收率高达 $(101.36 \pm 3.4)\%$, RSD 为 3.1% ($n=3$)。

关键词: 辅酶 Q_{10} ; 提取; 测定

中图分类号: Q 5-3

文献标识码: A

The Method of Extracting and Detecting of Co Q_{10} from Culture

WANG Gen-hua, Qian He, Xiao Gang

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: UV spectrophotometer was used to detect Co Q_{10} in this paper, and we got the most suitable extracting procedure as following: Wet culture was distilled at 90 ℃ for 30 min, and extracted with petroleum ether twice. The result showed that this method had good repeatability and stability, and the average recovery of Co Q_{10} was $(101.36 \pm 3.4)\%$, with RSD($n=3$) of 3.1%.

Key words: coenzyme Q_{10} (Co Q_{10}); extraction; measurement

辅酶 Q_{10} (Coenzyme Q_{10} , 简称为 Co Q_{10}), 又称泛醌, 是一种类维生素类物质, 脂溶性苯的衍生物。它在自然界中分布广泛, 主要存在于酵母、植物叶子和种子及动物的肝脏、肾脏中^[1,2]。辅酶 Q_{10} 是细胞呼吸链上的一种递氢体, 是细胞自身产生的天然抗氧化剂、细胞代谢激活剂。各种生物均含有一种特有的辅酶 Q, 除鼠外, 脊椎动物均含有辅酶 Q_{10} , 人类亦如此。

国外一般利用合成法或微生物发酵法生产辅酶 Q_{10} , 我国目前还停留在从动物组织中提取该产品阶段。在辅酶 Q_{10} 的各种生产方法中, 最具发展前景的生产方法是微生物发酵法。该方法的关键技术

就是辅酶 Q_{10} 产生菌的生产能力及如何从发酵菌体中提取辅酶 Q_{10} 。为此, 作者利用紫外分光光度法研究了提取发酵菌体中辅酶 Q_{10} 的方法——皂化提取法, 旨在为微生物发酵法生产辅酶 Q_{10} 的工作奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

751 型紫外分光光度计: 上海仪器分析厂制造。
HP1100 高效液相仪: 美国安捷公司制造; 辅酶 Q_{10} 标准样品: 日本协和发酵公司 (由中国科学院提供); 甲醇、石油醚等试剂、无水乙醇均为分析纯。

收稿日期: 2002-08-02; 修回日期: 2002-12-10。

作者简介: 王根华(1977-), 男, 江苏盐城人, 食品科学与工程硕士研究生; * 为责任作者。

1.2 培养基

种子培养基:葡萄糖 20 g/L;蛋白胨 10 g/L;酵母膏 2 g/L;NaCl 5 g/L;pH 7.0. 发酵培养基:玉米浆 20 g/L;蛋白胨 10 g/L;酵母膏 2 g/L;NaCl 5 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L;pH 7.0.

1.3 发酵菌体的制备

将辅酶 Q_{10} 产生菌活化后,接入 300 mL 发酵培养基中,在 30 ℃ 振荡(200 r/min)培养 20 h,收集发酵液,4 000 r/min 离心 30 min,倾去上清液,得到菌体,用蒸馏水充分洗涤,离心,称量发酵菌体质量,备用.

1.4 皂化法提取辅酶 Q_{10}

将菌体移入 150 mL 圆底烧瓶内,加入 0.7 g 焦性没食子酸,2.5 g KOH,19 mL 甲醇,7 mL 蒸馏水^[3],混匀.在 90 ℃ 水浴锅中回流 30 min,用自来水迅速冷却至室温,倒入分液漏斗,加入石油醚 40 mL,剧烈振荡 5 min,萃取辅酶 Q_{10} .连续萃取 2 次,合并萃取液,用蒸馏水洗涤至中性,加入 5 g 无水硫酸钠,干燥至液体澄清.用旋转蒸发仪(50 ℃)浓缩至干,并挥发完全,加入 5 mL 无水乙醇,放入冰箱冷冻析出胆固醇等杂质,过滤,滤液定容至 100 mL,待测.

1.4.1 皂化温度的确定 将上述水浴锅回流温度分别设定为 30, 50, 70, 90, 100 ℃,其他条件不变,测定所得辅酶 Q_{10} 的总量.

1.4.2 皂化时间的确定 将上述水浴锅回流时间分别设定为 10, 20, 30, 40, 50, 60 min,其他条件不变,测定所得辅酶 Q_{10} 的总量.

1.4.3 萃取次数的确定 将上述加入石油醚萃取次数分别设为 1, 2, 3, 4 次,其他条件不变,测定所得辅酶 Q_{10} 的总量.

1.5 紫外分光光度法测定辅酶 Q_{10} 的含量

1.5.1 标准曲线的绘制 准确称取 2.0 mg 辅酶 Q_{10} 标准样品,用无水乙醇定容至 100 mL,配成质量浓度为 0.02 mg/mL 标准溶液.分别移取 1, 2, 3, ..., 9 mL 该标准溶液定容至 10 mL,在辅酶 Q_{10} 最大吸收波长 275 nm 下测定其吸光度.

1.5.2 发酵菌体中辅酶 Q_{10} 含量的测定 在 275 nm 下测定辅酶 Q_{10} 提取液的吸光度(A),根据标准曲线计算其中辅酶 Q_{10} 的含量.

1.6 重现性实验

称取 3 份同批次发酵菌体各 5.0 g,用 1.4 所述方法提取辅酶 Q_{10} ,按 1.5.2 所述方法测定并计算每份样品中辅酶 Q_{10} 的含量,验证方法的重现性.

1.7 稳定性实验

称取发酵菌体 5.0 g,按照 1.4 所述方法提取,并按 1.5.2 所述方法测定吸光度(A 值),每隔 1 h 测定一次,连续 3 h 考察其稳定性.

1.8 加样回收率测定

精确称取 3 份同批次发酵菌体 5.0 g,各加入辅酶 Q_{10} 标样约 0.5 mg,按照 1.4 所述方法提取,并按 1.5.2 所述方法测定提取液中辅酶 Q_{10} 含量,扣除发酵菌体中辅酶 Q_{10} 的总质量(0.66 mg),计算回收率.

1.9 高效液相色谱验证实验结果的可靠性

用高效液相色谱(HPLC)测定发酵液中辅酶 Q_{10} 的含量.色谱条件:ZY110 色谱柱,250 mm×4.6 mm 不锈钢色谱柱,填料为十八烷基硅烷键合硅胶,直径为 10 μm ;流动相为 V(甲醇):V(乙醇)=1:1;流量 0.8 mL/min;检测波长为 275 nm;温度为 33 ℃;进样量 20 μL .^[5]

2 结果与讨论

2.1 标准曲线的绘制

根据不同质量浓度辅酶 Q_{10} 标准溶液在 275 nm 处的吸光度绘制标准吸收曲线(见图 1).由图 1 可知:(1)线形度很好($R^2 = 0.9955$),因此可以利用紫外分光光度法测定辅酶 Q_{10} 的含量;(2)辅酶 Q_{10} 标准吸收曲线的回归方程为: $y = 0.0168x - 0.0146$. x 为辅酶 Q_{10} 的质量浓度, Y 为吸光度.

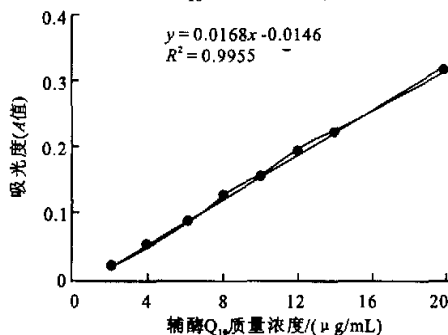


图1 辅酶 Q_{10} 标准吸收曲线

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

2.2 皂化提取温度的确定

按照不同的水浴温度,将提取所得辅酶 Q_{10} 含量绘制成图 2 所示曲线.由图 2 可知,随着皂化温度的上升,吸光度(A 值)也上升,辅酶 Q_{10} 含量也会上升,但当到达 70 ℃ 后,上升趋势不明显,到 90 ℃ 后,出现下降趋势.这是因为温度过高,辅酶 Q_{10} 可能发生了氧化或者加成反应而被破坏,因此选择皂

化温度为 90 ℃.

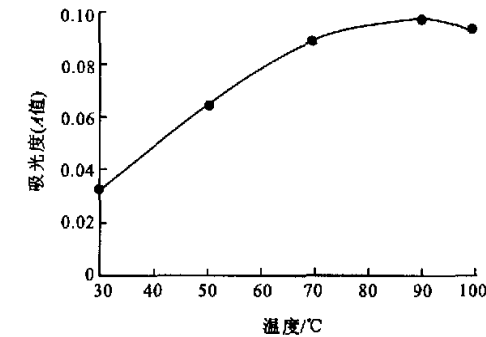


图 2 皂化温度对辅酶 Q₁₀得率的影响

Fig.2 The effect of saponification temperature

2.3 皂化时间的确定

将不同的皂化时间提取所得辅酶 Q₁₀溶液的吸光度(A 值)绘制成曲线,见图 3.由图 3 可知,随着皂化时间的延长,吸光度(A 值)也上升,但当到达 30 min 后,上升趋势变成下降趋势.这是因为在高温下,辅酶 Q₁₀可能发生了氧化或者加成反应而被破坏,因此选择皂化时间为 30 min.

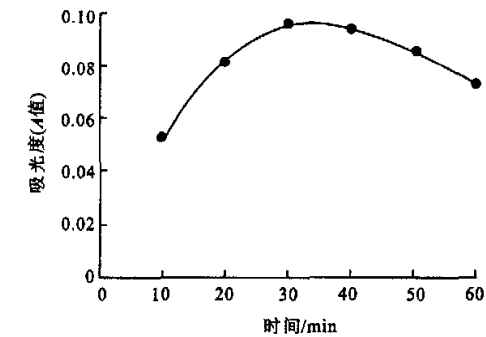


图 3 皂化时间对辅酶 Q₁₀得率的影响

Fig.3 The effect of saponification time

2.4 萃取次数对辅酶 Q₁₀含量的影响

将不同萃取次数所得辅酶 Q₁₀溶液的吸光度(A 值)绘制成曲线,见图 4.由图 4 可知,随着萃取次数的上升,吸光度(A 值)也上升,但当到达 2 次后,上升趋势不明显.这可能是辅酶 Q₁₀已经被萃取完全,因此选择萃取次数为 2 次.

2.5 皂化提取法的重现性

称取 5.0 g 发酵菌体,用皂化提取法和 1.5 所述方法测定辅酶 Q₁₀的含量,实验结果见表 1.

根据标准回归方程求得提取液中辅酶 Q₁₀的质量浓度为 6.6×10^{-3} mg/mL,进而可知每克发酵菌体中辅酶 Q₁₀为 0.13 mg.

由于整个提取、测定过程较长,因此导致 RSD 比其它分析方法的 RSD 大.所以,必须严格控制每

一步操作过程,特别是萃取、过滤等过程.

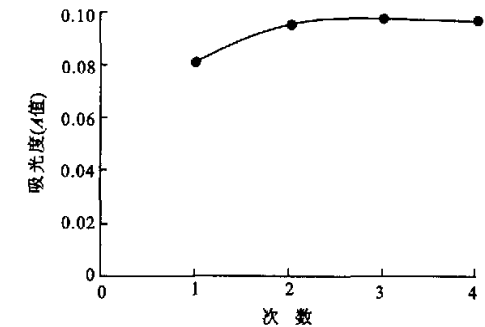


图 4 萃取次数对辅酶 Q₁₀得率的影响

Fig.4 The effect of extraction times

表 1 皂化提取法重现性实验结果

Tab.1 The results of repeatability

样品号	皂化提取法(A 值)
1	0.097
2	0.100
3	0.093
平均值	0.097
相对标准误差 RSD/ %	3.630

2.6 皂化提取法的稳定性

实验方法稳定性研究结果见表 2.由表知,该实验方法的稳定性较好.

表 2 皂化提取法稳定性实验结果

Tab.2 The results of stability

时间/h	吸光度(A 值)
0	0.102
1	0.102
2	0.103
3	0.102

2.7 加样回收率

加样回收率实验结果总结于表 3.由表 3 可知,该实验方法的平均回收率高达 $(101.36 \pm 3.4) \%$, RSD 为 3.1% ($n = 3$).

表 3 皂化提取法加样回收率测定结果

Tab.3 The results of recovery

发酵菌体质量/g	辅酶 Q ₁₀ 原始质量/mg	加入标样辅酶 Q ₁₀ 的量/mg	吸光度(A 值)	测定量/mg	回收率/%
5.0	0.66	0.51	0.183	1.18	101.96
5.0	0.66	0.48	0.180	1.16	104.17
5.0	0.66	0.49	0.178	1.14	97.96

注: $n = 3$.

2.8 高效液相(HPLC)验证结果

将用皂化法提取所得辅酶 Q_{10} 溶液在 275 nm 下,测定吸光度(A 值)0.090,然后换算得到辅酶 Q_{10} 的总量为 0.623 mg.再用 HPLC 测定,得到色谱图(见图 5).由图可知:(1)在 6.287 min 时出现的峰为辅酶 Q_{10} ,1.528 min 左右出现的峰均为杂质峰,不存在其它干扰峰;(2)由峰面积计算得到辅酶的质量浓度为 6.1×10^{-3} mg/mL,计算得到辅酶 Q_{10} 总量为 0.597 mg.这与紫外分光光度法测定所得的数据有一定误差.为此,作者研究了紫外分光光度法和 HPLC 实验结果的相关性.分别将测定得到吸光度为 0.032,0.045,0.059,0.071,0.090,0.102,0.121 的辅酶 Q_{10} 溶液做 HPLC 实验,换算得到辅酶 Q_{10} 的质量浓度分别为: 2.69×10^{-3} , 3.46×10^{-3} , 4.33×10^{-3} , 4.88×10^{-3} , 5.97×10^{-3} , 6.64×10^{-3} , 7.71×10^{-3} mg/mL.而按照方法 1.5 换算得到的辅酶 Q_{10} 的质量浓度为 2.77×10^{-3} , 3.55×10^{-3} , 4.38×10^{-3} , 5.10×10^{-3} , 6.23×10^{-3} , 6.94×10^{-3} , 8.07×10^{-3} mg/mL.根据这些数据绘制两种方法相关性图,见图 6.

从图 6 可以看出,两种方法存在良好的线性关系.因此紫外分光光度法可以作为筛菌、菌种发酵条件优化等实验时的检测方法.

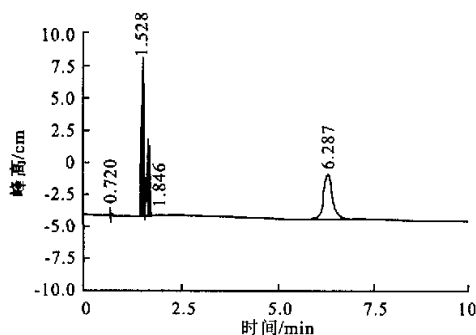


图 5 皂化法辅酶 Q_{10} 提取液 HPLC 图

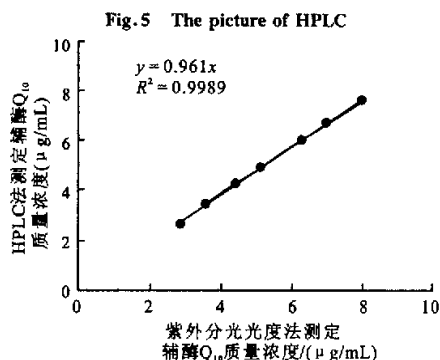


图 6 HPLC 和紫外分光光度法测定的相关性图

Fig. 6 The correlation of two methods

参考文献:

- [1] 沈同.生物化学[M].北京:人民教育出版社,1990.331.
- [2] Lenaz G. Coenzyme Q Biochemistry, Bioenergetics and Clinical Application of Ubiquinone[M]. New York: A Wiley Interscience Publication, 1984.33-47.
- [3] Folkers K. Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q[M]. Elsevier Holland, 1977.316.
- [4] Sithian Pandian. An alternative pathway for the biosynthesis of isoprenoid compounds in bacteria[J]. *Biochem J*, 1981,194(2): 675-681.
- [5] 郝苏丽, 吴越, 徐康. HPLC 法测定辅酶 Q_{10} 方法的研究[J]. 中国生化药物杂志, 1998, (4):167-171.

(责任编辑:杨 勇)