

糙米辅酶 Q₁₀ 含量的分析

叶新福^{1,2}, 何琴¹, 潘蔚³, 卢礼斌¹, 叶宁¹, 郑金贵²

(1. 福建省农业科学院水稻研究所, 福建 福州 350018; 2. 福建农林大学农产品品质研究所, 福建 福州 350002; 3. 福建省农业科学院中心实验室, 福建 福州 350001)

摘要: 采用高效液相色谱法 (HPLC) 对糙米中辅酶 Q₁₀ 的含量进行测定, 并对测定技术进行了优化。用该技术分析研究了 100 个水稻品种 (含恢复系和种质资源) 的辅酶 Q₁₀ 含量, 其含量范围为 $0.30 \pm 0.03 \sim 5.36 \pm 0.04 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 品种之间糙米辅酶 Q₁₀ 含量差异极显著。辅酶 Q₁₀ 含量最高的为恢复系 4B233 ($5.36 \pm 0.04 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 是最低含量的 178.67 倍。

关键词: 糙米; 辅酶 Q₁₀; 高效液相色谱法

中图分类号: S 511

文献标识码: A

Determination of CoQ₁₀ in Brown Rice of Different Genotypes

YE Xinfu^{1,2}, HE Qing², PAN Wei³, LU Libin², YE Ning², ZHENG Jingu¹

(1. Rice Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350019, China;

2. Agricultural Product Quality Institute, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 3. Center Lab, Fujian Academy of Agricultural Sciences Fuzhou, Fujian 350001, China)

Abstract: High performance liquid chromatography (HPLC) was employed to determine the CoQ₁₀ in brown rice with different genotype. The testing methodology was optimized in the meantime. Content of CoQ₁₀ in 100 varieties (including restore lines and germ plasm resources of the rice) was determined by using HPLC. The contents ranged from $0.30 \pm 0.03 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ to $5.36 \pm 0.04 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ indicating very significant differences of CoQ₁₀ content existing among the various brown rice varieties. The restore line 4B233 had the highest content of CoQ₁₀ (i.e., $5.36 \pm 0.04 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), which was 178.67 times greater than the lowest.

Key words: Brown rice; Coenzyme Q₁₀; HPLC

辅酶 Q₁₀ (CoQ₁₀) 是一种重要的脂溶性类维生素, 主要位于细胞线粒体中, 作为至少 3 种线粒体酶 (复合物 I、II、III) 的辅酶, 在细胞能量三磷酸腺苷 (ATP) 生成和需氧养分 (碳水化合物、脂肪和氨基酸) 分解过程中不可或缺。CoQ₁₀ 具有抗氧化、清除自由基和提高免疫力的功能, 目前已广泛运用于心血管疾病、帕金森症、癌症、爱滋病等疾病的临床治疗中; 同时, 在化妆品中添加 CoQ₁₀ 能够延缓皮肤衰老、抗皱、抗辐射^[1-2]。

植物中的辅酶 Q₁₀ 多集中于含油种子或嫩芽、嫩叶中^[3-4]。目前, 已有 HPLC 法测定大豆、玉米、烟草^[1,4-6] 等的报道, 但还没有关于稻米中含有 CoQ₁₀ 的报道。水稻是我国重要的粮食作物, 稻

米中的营养成分对整个国民的健康状况具有重要影响。因此, 本研究采用高效液相色谱法测定糙米中辅酶 Q₁₀ 含量, 并对试验条件进行了优化, 试验结果已做过简要报道^[7]。并利用优化方法测定了 100 份水稻材料, 以期筛选出高辅酶 Q₁₀ 含量的水稻品种或种质, 以待功能稻利用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和材料

1.1.1 水稻材料 辅酶 Q₁₀ 优化处理品种为福建省农业科学院水稻研究所特种稻课题选育的品种 4B236 (经多次初步筛选研究认为该组合含量较高)。

收稿日期: 2009-06-19 初稿; 2009-08-27 修改稿

作者简介: 叶新福 (1967-), 男, 研究员, 研究方向: 水稻品质育种 (E-mail: yexinfu@126.com)

通讯作者: 郑金贵 (1949-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 作物品质遗传育种 (E-mail: jgzheng@fjau.edu.cn)

基金项目: 福建省农业科技重大专项 (2008NZ0001-4); 农业部重大专项 (2009ZX08001-032B); 福建省科技创新平台建设计划项目 (2007S1001); 福建省科技重点项目 (2007N0034)

批量测试材料为课题 100 个不同来源的籼稻恢复系材料和育成的水稻品种, 包括福建省农业科学院水稻研究所的 28 份早熟恢复系 4D 系列、36 份迟熟恢复系 4B 系列以及 28 份品种资源和引进恢复系 4R、4P 系列。

1.1.2 主要仪器和药品 浙江台州小型糙米机; 九阳粉碎机; 上海沪西 WH-2 旋涡混合器; eppendorf 5804R 高速冷冻离心机; 宁波新艺 JY92-II 超声波细胞粉碎机; 上海亚荣 RE-52CS 旋转蒸发仪; 上海科导 SK5210HP 超声波清洗器; 上海亚荣 SHB-II 循环水真空泵; waters 2695-2996 高效液相色谱仪; METTLER TOLEDO AL204 电子天平。

乙腈、甲醇和异丙醇为 Merck 色谱纯, 其他试剂均为分析纯。辅酶 Q₁₀ 标准品为 Sigma 公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 稻米粉的准备 以收割储藏的稻谷为材料, 将稻谷用小型糙米加工机碾成糙米, 将糙米用粉碎机粉碎成粉末, 过 80 目筛, 将稻米粉装袋、封好, 于室温下保存于干燥瓶中备用。

1.2.2 提取方法 称取样品 5 g 置于 50 mL 离心管中, 加入 30 mL 70% 甲醇, 旋涡混合 5 min, 离心 (30 °C, 5 000 $r \cdot min^{-1}$, 10 min), 去上清液。固体物中加入 30 mL 溶剂, 混匀, 超声破碎 (4 S, 4 S, 400 W, 50 次), 离心得上清液, 重复 1 次, 合并上清液; 将上清液进行旋转蒸发浓缩至近干, 加入流动相定容, 超声清洗 (功率 100%, 5 min); 溶液过 0.45 μm 滤膜, 进行 HPLC 检测, 计算 CoQ₁₀ 含量^[4, 8-9]。

1.2.3 高效液相色谱仪分析条件 色谱柱: no-vapak C18 柱; 流动相: 乙腈—异丙醇 (70: 30); 流速: 1 $mL \cdot min^{-1}$; 进样量: 10 μL ; 检测波长: 275 nm; 柱温: 35 °C。每个样品连续进样 3 针, 取平均值, 以标样出峰时间和峰高叠加定性, 外标法峰面积定量^[4, 10]。

2 结果与分析

2.1 辅酶 Q₁₀ 的定性分析

浓缩后, 可以观察到烧瓶瓶壁上附有黄色物质, 这与辅酶 Q₁₀ 在室温下为黄色或橙黄色结晶状粉末的性质是一致的。从图 1 样品和标准的色谱图可以看出, 本方法的辅酶 Q₁₀ 保留时间在 8.53 min 附近, 样品与标样的保留时间是一致的; 同时, 从图 2 可以看出, 样品在 275 nm 处有吸收特征峰,

这与相关报道以及标准的吸收特征也是一致的。因此, 判断在糙米中提取得到辅酶 Q₁₀。曾有研究报道过稻谷中以辅酶 Q₉ 为主要成分的辅酶 Q 同系物成分分析^[3], 因而这是首次在稻米中提取到辅酶 Q₁₀ 的报道。

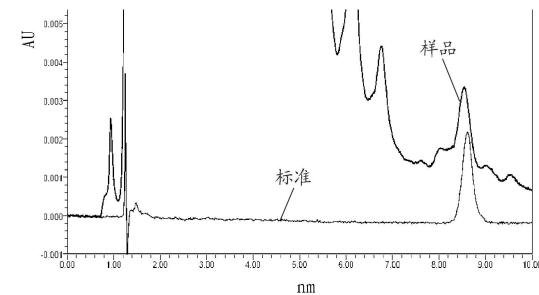


图 1 标准与样品的叠加色谱图

Fig 1 Chromatograms of standard and sample

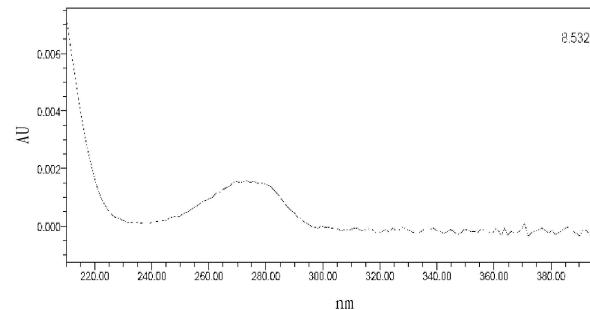


图 2 辅酶 Q₁₀ 的光谱图

Fig 2 CoQ₁₀ spectra

2.2 不同溶剂对提取的影响

取恢复系 4B236 糙米粉 6 份, 如表 1 所示, 各处理按从左到右顺序, 按 1.2.2 提取方法进行提取。浓缩完加 4 mL (2 mL + 2 mL) 流动相定容。不同的溶剂提取结果表明: 提取前加入 70% 甲醇预处理能提高样品的提取率, 再用正己烷提取, 效果最好^[4, 10]。

2.3 不同定容体积对提取的影响

取 4 份样品, 按 70% 甲醇 + 正己烷 + 正己烷方案, 平行处理。浓缩后, 分别加 (1 mL + 1 mL)、(2 mL + 1 mL + 1 mL)、(2 mL + 2 mL)、(3 mL + 3 mL) 流动相分次定容。结果表明: 加流动相的次数越多, 定容体积越大, 辅酶 Q₁₀ 能更彻底地溶解到流动相中, 提取到的辅酶 Q₁₀ 含量越高 (表 2)。但定容体积越大, 样品的浓度越低, 可能误差也越大, 综合考虑选用 (2 mL + 1 mL + 1 mL) 的定容方案较为可行。

表1 不同提取溶剂的CoQ₁₀含量(2007)Table 1 Determination of CoQ₁₀ with different solvents

提取溶剂		含量 (mg·kg ⁻¹)
70% 甲醇	氯仿	1.82
-	氯仿	1.33
70% 甲醇	正己烷	2.15
-	正己烷	1.54
70% 甲醇	丙酮	2.10
-	丙酮	1.87

表2 不同定容体积提取的CoQ₁₀含量Table 2 Determination of CoQ₁₀ with different constant volumes

定容体积与次数	含量 (mg·kg ⁻¹)
1 mL+ 1 mL	1.97
2 mL+ 1 mL+ 1 mL	2.23
2 mL+ 2 mL	2.16
3 mL+ 3 mL	2.21

2.4 回收率测定

采用添加标样法测定回收率。取稻米粉样品4份, 其中1份空白, 精密吸取辅酶Q₁₀标准品溶液(40 mg·kg⁻¹) 50 mL、125 mL、250 mL, 分别

加入另3份样品中。按提取步骤平行处理, 并在相同色谱条件下分别进样, 结果如图4: 各样品的色谱图在与标样相同的保留时间时均有吸收峰, 并且加标样品随着加入标样量的增加, 色谱峰的峰高和峰面积均增大, 说明样品和添加的辅酶Q₁₀能很好的叠加出峰。结果表明: 加标回收率分别为95.2%、98.7%、101.8%; 此测定方法保留时间较稳定, 回收率也基本符合微量分析要求, 说明该提取、纯化、浓缩方法和HPLC色谱条件是可行的。

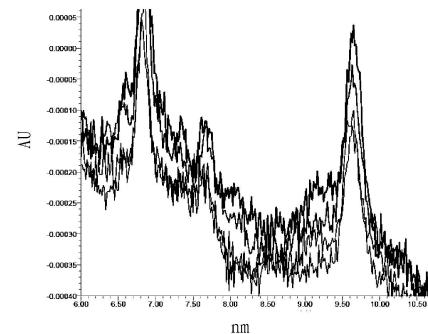
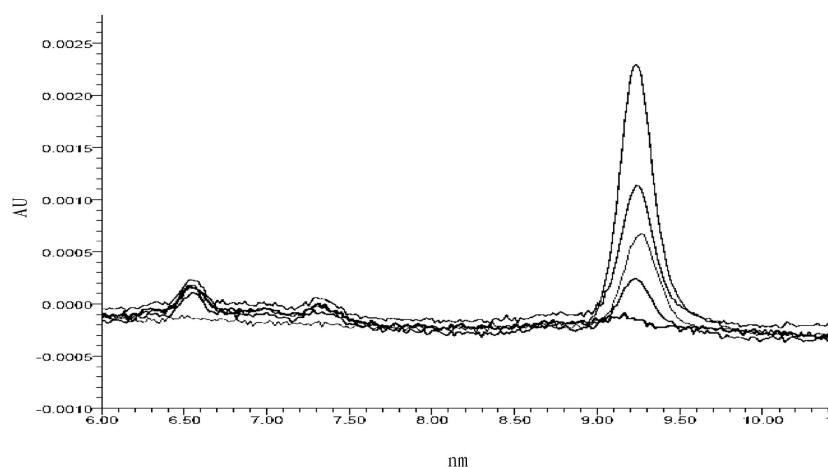
图3 不同定容体积辅酶Q₁₀的色谱图Fig 3 Chromatograms of CoQ₁₀ with different constant volumes

图4 加样回收色谱图

Fig 4 Chromatograms of recovery of added CoQ₁₀

2.5 水稻糙米辅酶Q₁₀含量测定

测定了100个品种(种质资源)的辅酶Q₁₀含量, 其范围为0.30±0.03~5.36±0.04 mg·kg⁻¹, 品种之间糙米辅酶Q₁₀含量呈极显著差异。含量最高的为4B233(5.36±0.04 mg·kg⁻¹), 是最低含量

的178.67倍, 是平均含量的1.40倍, 是恢复系蜀恢527(p42-8, 1.32±0.03 mg·kg⁻¹)的4.06倍、镇恢084(p42-11, 0.77±0.15 mg·kg⁻¹)的6.96倍、圭630(p42-44, 0.72±0.06 mg·kg⁻¹)的7.44倍。

表 3 100 个籼稻材料糙米辅酶 Q₁₀ 含量
Table 3 Content of CoQ₁₀ in 100 varieties of brown Indica rice

序号	品种	含量 (mg·kg ⁻¹)	序号	品种	含量 (mg·kg ⁻¹)	序号	品种	含量 (mg·kg ⁻¹)
1	4B134	0.60±0.04	35	4B950	0.69±0.04	69	P42- 45	1.21±0.04
2	4B135	0.48±0.07	36	4B1086	0.67±0.05	70	P42- 46	1.98±0.12
3	4B136	0.30±0.03	37	4R1	4.23±0.26	71	P42- 47	0.60±0.02
4	4B154	0.91±0.05	38	4R144	2.73±0.08	72	P42- 48	0.65±0.08
5	4B189	0.59±0.02	39	4R145	4.23±0.26	73	4D1	0.94±0.09
6	4B220	0.77±0.11	40	4R287	3.41±0.08	74	4D2	0.94±0.09
7	4B233	5.36±0.04	41	4R288	1.83±0.04	75	4D13	0.85±0.05
8	4B234	3.58±0.06	42	4R289	3.41±0.08	76	4D15	0.93±0.04
9	4B235	2.40±0.07	43	4R479	3.49±1.06	77	4D16	0.93±0.04
10	4B236	2.74±0.08	44	4R480	1.98±0.09	78	4D20	0.97±0.05
11	4B289	0.84±0.04	45	4R481	3.49±1.06	79	4D21	0.87±0.04
12	4B325	0.61±0.07	46	P42- 5	1.61±0.02	80	4D22	0.91±0.13
13	4B405	0.82±0.15	47	P42- 6	0.81±0.04	81	4D23	1.64±0.13
14	4B416	0.92±0.11	48	P42- 7	0.66±0.10	82	4D24	0.91±0.13
15	4B417	0.92±0.11	49	P42- 8	1.32±0.03	83	4D30	1.10±0.02
16	4B418	0.76±0.03	50	P42- 9- 1	1.19±0.01	84	4D45	1.38±0.07
17	4B442	0.98±0.10	51	P42- 9- 2	1.53±0.07	85	4D65	1.62±0.01
18	4B450	1.04±0.13	52	P42- 9- 3	1.46±0.03	86	4D77	1.37±0.06
19	4B509	0.95±0.19	53	P42- 10	0.73±0.05	87	4D94	1.58±0.12
20	4B520	0.82±0.04	54	P42- 11	0.77±0.15	88	4D132	0.99±0.12
21	4B534	0.66±0.09	55	P42- 12	1.62±0.04	89	4D190	1.74±0.07
22	4B540	0.96±0.23	56	P42- 13	1.66±0.03	90	4D191	1.48±0.07
23	4B564	0.58±0.10	57	P42- 14	0.83±0.10	91	4D192	1.42±0.07
24	4B581	0.89±0.12	58	P42- 15	1.43±0.09	92	4D193	2.55±0.06
25	4B602	0.84±0.13	59	P42- 16	0.81±0.02	93	4D248	0.77±0.12
26	4B614	0.80±0.07	60	P42- 17	1.04±0.16	94	4D324	0.90±0.11
27	4B765	0.76±0.10	61	P42- 18	1.12±0.06	95	4D36	1.56±0.16
28	4B811	0.67±0.10	62	P42- 21	1.91±0.03	96	4D363	0.87±0.09
29	4B837	3.74±0.06	63	P42- 22	0.96±0.24	97	4D364	1.04±0.03
30	4B838	3.74±0.06	64	P42- 26	1.70±0.02	98	4D415	0.77±0.02
31	4B839	0.70±0.02	65	P42- 27	0.85±0.03	99	4D423	0.94±0.15
32	4B870	0.68±0.05	66	P42- 42	1.82±0.08	100	4D424	0.94±0.15
33	4B892	0.76±0.02	67	P42- 43	1.44±0.03			
34	4B914	0.67±0.01	68	P42- 44	0.72±0.06			

3 结论与讨论

本文只是借助色谱图、光谱图及物质的颜色初步判断糙米中含有辅酶 Q₁₀，今后将开展多方面的定性试验，对提取物进行更准确地定性。本试验首次发现稻米中含有辅酶 Q₁₀，可能是由于近年来科

技不断发展，HPLC 技术不断成熟，新仪器的检测灵敏度不断提高，实现了样品更有效分离的缘故。本试验材料是在较大量筛选各类水稻品种的基础上得到的，品种之间辅酶 Q₁₀ 含量呈显著性差异。因此通过水稻品种培育富含辅酶 Q₁₀ 的功能稻是可行的。

为了提高HPLC法的分析测定效率,本试验采用先真空旋转蒸发浓缩再用流动相定容的方法代替直接取提取液进样的方法。该法既可以满足HPLC对微量分析的要求,又降低了由提取液中溶剂对出峰影响带来的误差。同时,本法采用超声波细胞破碎仪代替超声波清洗器进行提取,能更有效更彻底地将位于细胞内的辅酶Q₁₀提取出来,同时也缩短了提取时间^[9~10]。对比3种提取溶剂,氯仿由于密度较大,离心后固液无法很好分离,此操作易造成损失;而丙酮提取物中含有较多杂质,无法很好地得到分离,容易给辅酶Q₁₀的定量带来误差。加入70%甲醇可以去掉一些脂溶性杂质,同时能增强组织细胞的穿透力,有利于后继目标成分的提取^[4, 10]。

辅酶Q₁₀作为一种广泛存于与人体细胞中不可缺少的组成成分,它在维持人体各部分机能正常运作、抗氧化等方面起到了重要作用。临床研究指出,人体中辅酶Q₁₀含量与许多疾病的发生、发展都存在直接或间接的关系。人体中的辅酶Q₁₀主要来源于人体的自身合成,然而由于该合成过程极其复杂,需要多种营养物质的参与,而人们普遍地摄入营养物质不足或不均衡,这也意味着人体中普遍缺乏辅酶Q₁₀^[2]。因此,含辅酶Q₁₀水稻品种的筛选成功将对改善以水稻为主食的人群的健康状况产生深远的影响,今后应加强发芽糙米的辅酶Q₁₀含

量研究。

参考文献:

- [1] 史劲松, 许正宏. 辅酶Q₁₀生产应用研究进展及产业展望 [J]. 中国科技成果, 2003 (5): 26~29.
- [2] 张雪崧, 孙庆元. 辅酶Q₁₀的开发在医疗保健中的应用前景 [EB/OL]. (2006-01-19). <http://www.paper.edu.cn>.
- [3] KAMET M, 王春林. 辅酶Q₁₀在食物中的分布及含量 [J]. 中国生化药物杂志, 1992 (2): 73~74.
- [4] 吕欣, 庞海河, 史权, 等. 环境影响因子对玉米芽中辅酶Q₁₀含量的影响 [J]. 植物研究, 2004, 24: 201~203.
- [5] 王春林. 中国大豆辅酶的提取、分离和鉴定 [J]. 中国医药工业杂志, 1996, 27: 102~105.
- [6] ZU Y G, ZHAO C J, LI C Y, et al. A rapid and sensitive LC-MS/MS method for determination of coenzyme Q₁₀ in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves [J]. Journal of Separation Science, 2006, 29: 1607~1612.
- [7] 郑金贵. 作物优异种质资源及其品质相关基因克隆研究的若干进展 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2007, 36 (2): 138~142.
- [8] 汪茂田, 谢培山, 王忠东, 等. 天然有机化合物提取分离与结构鉴定 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 5~22.
- [9] 朱秀灵, 车振明, 唐洁, 等. 采用超声波法提高胡萝卜汁中的β-胡萝卜素含量 [J]. 食品与发酵工业, 2004, 30: 17~20.
- [10] 江平, 何代平, 许国旺. 血浆辅酶Q₁₀的高效液相色谱快速测定 [J]. 分析测试学报, 2006, 25 (2): 106~108.

(责任编辑:林海清)