·论　著·

液相色谱-串联质谱法同时测定人血浆中的还原型和氧化型辅酶 Q10

袁　博[1]，李　烜[2]，李鹏飞[3,4△]

1. 天津市医疗器械质量监督检验中心，天津 300384；2. 天津市医疗器械审评查验中心，天津 300191；3. 首都医科大学附属北京安定医院药事部/国家精神心理疾病临床医学研究中心/国家精神疾病医学中心/精神疾病诊断与治疗北京市重点实验室，北京 100088；4. 首都医科大学人脑保护高精尖创新中心，北京 100069

摘　要：目的　建立一种快速、灵敏的液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）法用于同时测定人血浆中的还原型辅酶 Q10（泛醇-10）和氧化型辅酶 Q10（泛醌-10），并实现临床应用。**方法**　血浆标本经甲醇沉淀蛋白，以辅酶 Q9 为内标，使用 Kinetex C18（3.0×50 mm，2.6 μm，100Å）色谱柱等度洗脱进行柱分离。采用电喷雾离子源正离子化方式，以多反应监测方式进行质谱定量检测。考察该方法的特异性、标准曲线与定量下限、精密度与正确度、稳定性等。**结果**　泛醇-10 和泛醌-10 的保留时间分别为 1.07 和 1.81 min，单个样品分析时间为 3.2 min。泛醇-10 和泛醌-10 分别在 50～2 000 和 1～100 ng/mL 的线性范围内具有良好的线性关系，且定量下限均可达 1 ng/mL。批内和批间精密度均≤9.7%，正确度为 96.2%～103.9%，该方法具备较高的正确度和精密度。室温放置 6 h、4～8 ℃冷藏 5 d、－20 ℃冷冻放置 30 d 存放条件不影响对分析物浓度进行准确测定。**结论**　该方法分析时间短，灵敏度较高，血浆用量少，适用于血浆标本中泛醇-10 和泛醌-10 的血药浓度监测及准确测定。

关键词：辅酶 Q10；　液相色谱-串联质谱法；　还原型辅酶 Q10；　氧化型辅酶 Q10；　血药浓度监测

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2024.23.018　　**中图法分类号：**R446.1

文章编号：1673-4130(2024)23-2908-05　　**文献标志码：**A

Simultaneous determination of reduced and oxidized coenzyme Q10 in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry

YUAN Bo[1], *LI Xuan*[2], *LI Pengfei*[3,4△]

1. *Tianjin Medical Device Quality Supervision and Inspection Center, Tianjin* 300384, *China*;
2. *Tianjin Medical Device Evaluation and Inspection Center, Tianjin* 300191, *China*;
3. *Department of Pharmacy, Beijing Anding Hospital, Capital Medical University/National Clinical Research Center for Mental Disorders/National Center for Mental Disorders/Beijing Key Laboratory of Mental Disorders, Beijing* 100088, *China*;
4. *Advanced Innovation Center for Human Brain Protection, Capital Medical University, Beijing* 100069, *China*

Abstract: Objective　To establish a rapid and sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the simultaneous determination of reduced coenzyme Q10 (ubiquinol-10) and oxidized coenzyme Q10 (ubiquinone-10) in human plasma, and to achieve clinical application. **Methods**　Plasma samples were precipitated with methanol and protein, and using coenzyme Q9 as the internal standard, Kinetex C18 (3.0×50 mm, 2.6 μm, 100Å) column were used for separation with equal elution. Mass spectrometry quantitative detection was carried out by multi reaction monitoring with positive ionization of electrospray ion source. The specificity, standard curve and lower limit of quantification, precision and accuracy, stability of this method were examined. **Results**　The retention times for ubiquinol-10 and ubiquinone-10 were 1.07 and 1.81 minutes, respectively, and the analysis time for a single sample was 3.2 minutes. Ubiquinol-10 and ubiquinone-10 had good linear relationships in the linear range of 50－2 000 and 1－100 ng/mL, respectively, and the lower limit of quantification could both reach 1 ng/mL. The precision within and between batches were ≤ 9.7%, and the accuracy was between 96.2%－103.9%. This method had high accuracy and precision. Storing at room temperature for 6 hours, refrigerating at 4－8 ℃ for 5 days, and freezing at －20 ℃ for 30 days did not affect the accurate determination of analyte concentration. **Conclusion**　This method has a short analysis time,

作者简介：袁博，女，工程师，主要从事体外诊断试剂和生物学评价研究。　△ **通信作者**，E-mail：lee-pf@ccmu.edu.cn。

high sensitivity, and low plasma dosage, and is suitable for monitoring and accurately determining the blood drug concentrations of ubiquinol-10 and ubiquinone-10 in plasma samples.

Key words: coenzyme Q10;　liquid chromatography-tandem mass spectrometry;　reduced coenzyme Q10;　oxidized coenzyme Q10;　blood drug concentration monitoring

辅酶 Q10 广泛存在于人类细胞膜中，尤其是线粒体膜中的脂溶性醌类化合物。在人体中 95% 的辅酶 Q10 以还原型辅酶 Q10(泛醇-10)的形式存在，但是在脑和肺这两种组织中多以氧化型辅酶 Q10(泛醌-10)的形式存在。辅酶 Q10 是参与真核细胞线粒体电子传递链和有氧呼吸的重要物质，它具有多种益处，包括抗氧化、清除自由基、增强人体免疫力、延缓衰老、减轻疲劳及保护心血管健康等[1-3]。目前，辅酶 Q10 制剂已应用于心血管疾病、肿瘤的辅助治疗及抗衰老的护肤品中。

辅酶 Q10 在人体内的合成和代谢过程相对复杂，体内通过一系列反应，将泛酰基分子合成辅酶 Q10 的前体物质，并最终形成辅酶 Q10。同时，辅酶 Q10 也可以通过食物摄入，主要来源为动物内脏、牛肉、鱼肉等食物。辅酶 Q10 在临床应用中具有广泛的价值，但需要注意监测相关指标，以确保患者的安全和治疗效果。通过血液检测可以了解患者体内辅酶 Q10 的水平，从而评估治疗效果和调整治疗方案。

目前，对于辅酶 Q10 水平测定的研究多集中在饲料、食品和药品领域，对人体内辅酶 Q10 水平的检测报道较少，且研究报道测定的辅酶 Q10 多为泛醌-10，而人体内还同时存在泛醇-10[4-9]。因此，有必要建立一种可以同时测定人体内泛醇-10 和泛醌-10 的方法，便于开展体内药物浓度监测或临床研究等相关评价。液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)具有高灵敏度和特异度的特点。本研究旨在研发一种更为快速且灵敏的 LC-MS/MS，以同时测定人血浆中的泛醇-10 和泛醌-10 水平，进而适用于临床上对辅酶 Q10 水平的监测。

1　材料与方法

1.1　仪器与试剂　CaLQuant-S LC-MS/MS 检测系统购自杭州凯莱谱精准医疗检测技术有限公司；配有 AnaLyst1.7.2 数据处理系统购自美国 Sciex 公司。泛醌-10 对照品(纯度 99.8%，批号：140611-202107)和辅酶 Q9 对照品(内标，纯度 99.9%，批号：140841-201902)均购自中国食品药品检定研究院；泛醇-10 对照品(纯度 97.0%，批号：11-NZZ-43-2)购自曼哈格(上海)生物科技有限公司。牛血浆白蛋白购自广州鸿泉生物科技有限公司；异丙醇(分析纯)和二甲基亚砜(DMSO，纯度 99.5%，批号：20230804)均购自天津市科密欧化学试剂有限公司；甲醇(分析纯)购自上海星可高纯溶剂有限公司。

1.2　溶液的配制　精密称取泛醇-10 和泛醌-10 标品，泛醇-10 用异丙醇和 DMSO(1∶9，v/v)混合液配制成 1 mg/mL 的标准储备液，泛醌-10 用异丙醇配制成 1 mg/mL 的标准储备液。将泛醇-10 和泛醌-10 的标准储备液适量加入 4%BSA 溶液中，配制成标准曲线系列浓度点，其中泛醌-10 系列浓度为 1、5、20、50、100 ng/mL，泛醇-10 系列浓度为 50、100、500、1 000、2 000 ng/mL。重新称取泛醇-10 和泛醌-10 标品，分别配制 1 mg/mL 的质控储备液，将泛醇-10 和泛醌-10 的质控储备液适量加入 4%BSA 溶液中，配制成质控标本，其中泛醌-10 质控标本浓度为 4、50、90 ng/mL，泛醇-10 质控标本浓度为 80、1 000、1 800 ng/mL。精密称取辅酶 Q9 适量，用异丙醇溶解，以甲醇稀释配制成 50 ng/mL 的内标溶液。

1.3　测定条件　色谱条件如下，色谱柱：Kinetex C18(3.0×50.0 mm，2.6 μm，100Å)；流动相：0.1%甲酸水－0.1%甲酸和甲酸铵的甲醇(1∶99，v/v)等度洗脱，流速为 0.7 mL/min，柱温 40 ℃；进样量 5 μL；分析时间 3.2 min。

质谱条件如下，电喷雾离子源正离子模式(ESI^+)，扫描方式为多反应监测(MRM)，采用碰撞活化解离(CAD)，离子源温度是 500 ℃，离子喷射电压(IS)为 5.5 kV；鞘气(GAS1)为 345 kPa，雾化气(GSA2)为 310 kPa；化合物和内标 MRM 参数见表 1。

表 1　泛醇-10 和泛醌-10 的 MRM 参数

分析物	前体离子	产物离子	解簇电压(V)	碰撞能量(eV)
辅酶 Q9	796.0	197*	120	35
泛醇-10	882.7	197*	110	40
泛醌-10	880.7	197*	110	40

注：* 为定量子离子。

1.4　方法学考察

1.4.1　LC-MS/MS 分析　血浆标本处理如下，取样品 50 μL 至离心管中，加入内标液 250 μL，涡流混合 1 min 后离心 10 min(12 000 r/min)，取上清液 200 μL 进行 LC-MS/MS 分析。泛醇-10 和泛醌-10 为人体内源性物质且水平存在较大个体差异，不宜采用空白人血浆建立标准曲线，因此本研究采用 BSA(4%的牛血浆白蛋白)作为基质建立标准曲线并进行方法学验证。为了评估方法的特异性，笔者对比了空白基质、空白基质加标及实际血浆标本。在制备好标准曲线后，笔者按照上述血浆标本处理步骤进行操作，取上清液并通过 LC-MS/MS 进行测定分析。以待测物的浓度为横坐标，待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标，使用加权($w=1/x^2$)最小二乘法进行回归运算，从而得到标准曲线。根据当日的标准曲线，笔者计算

了定量下限、正确度、精密度和稳定性，并将这些参数应用于实际标本的定量检测中。

1.4.2　定量下限　为了评估定量下限，选择泛醇-10 和泛醌-10 浓度均为 1 ng/mL 的标本，平行处理 10 个标本，每个标本重复测定 2 次，计算每个标本的信噪比(S/N)、精密度及浓度测定均值与理论浓度的偏差。要求定量下限标本的 S/N≥10。

1.4.3　正确度与精密度　于 3 个分析批次分别重复处理及测定低、中、高 3 个浓度的泛醇-10 和泛醌-10 质控标本，每个浓度 10 个平行标本。计算每个批次中 3 个浓度 10 次测量值的相对回收率和变异系数，以及 3 个浓度 30 次测量值的相对回收率和变异系数，分别代表批内和批间的正确度与精密度。

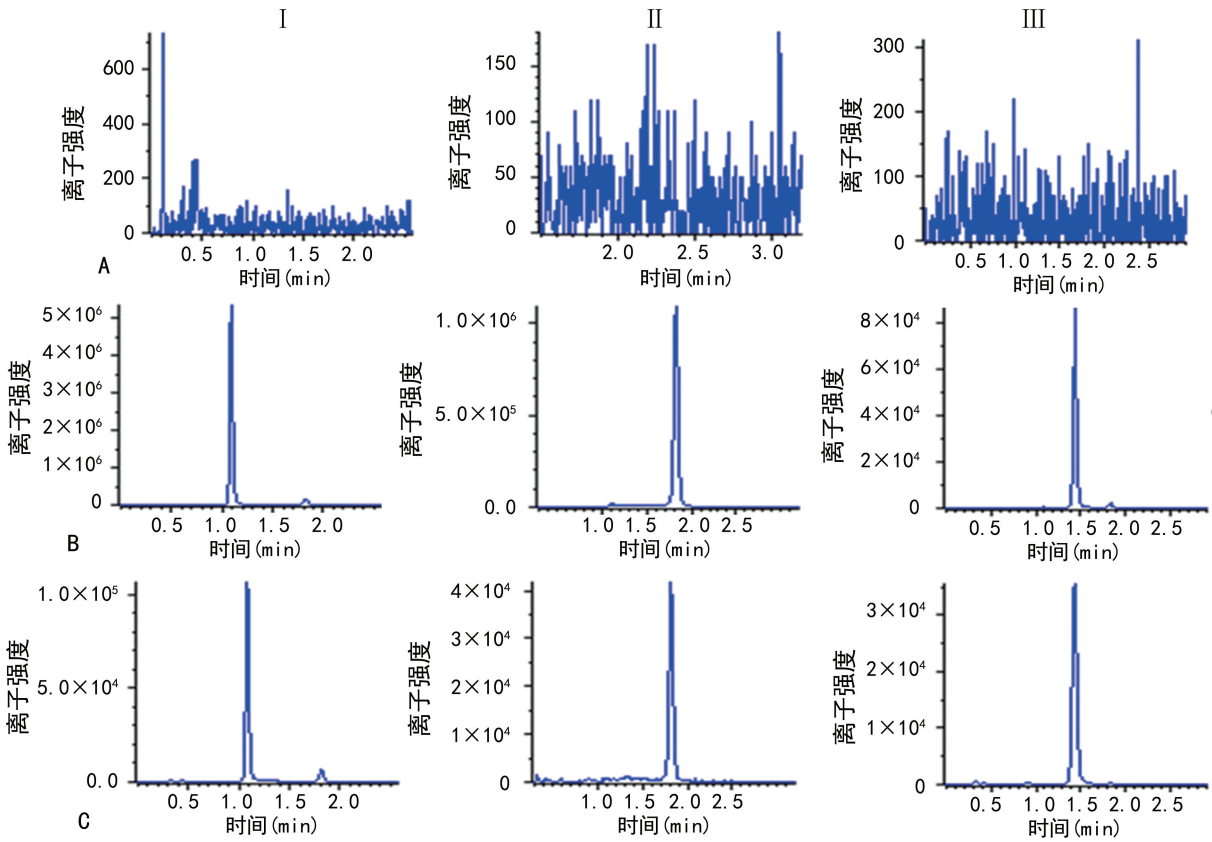
1.4.4　稳定性　为了考察泛醇-10 和泛醌-10 的稳定性，配制了低、高两个质控浓度的稳定性标本(每个浓度 6 例标本)。血浆标本分别在室温下放置 4 h、4～8 ℃冷藏 5 d、－20 ℃冷冻放置 30 d 后进行浓度测定，以及血浆标本处理后上清液放置 12 h 进行测定，分别用于评估泛醇-10 和泛醌-10 的稳定性。

1.5　方法学应用　收集 58 份临床血浆标本，按照上述血浆标本处理步骤操作，取上清液经 LC-MS/MS 测定，计算血浆标本泛醇-10 和泛醌-10 水平，考察水平分布情况。

2　结　　果

2.1　方法学评价

2.1.1　特异性考察结果　特异性考察典型质谱离子流见图 1，对比空白基质、空白基质加标、实际血浆标本，泛醇-10、泛醌-10 和内标辅酶 Q9 的保留时间分别为 1.07、1.81、1.40 min，BSA 基质相对干净，无明显干扰峰存在，实际人血浆测定中峰型较好，也无明显杂峰影响定量，表明 BSA 及人血浆标本中的其他物质不会对泛醇-10 和泛醌-10 的测定造成干扰。



注：A 为空白基质；B 为空白基质加标(泛醇-10 浓度 200 ng/mL，泛醌-10 浓度 40 ng/mL)；C 为实际血浆标本(测得泛醇-10 浓度 146.7 ng/mL、泛醌-10 浓度 3.4 ng/mL)；Ⅰ为泛醇-10；Ⅱ为泛醌-10；Ⅲ为内标(50 ng/mL)。

图 1　泛醇-10 和泛醌-10 的典型质谱离子流图

2.1.2　标准曲线和定量下限考察结果　用加权($w=1/x^2$)最小二乘法进行回归运算，泛醇-10 和泛醌-10 的线性范围分别为 50～2 000 ng/mL 和 1～100 ng/mL，典型回归方程分别为 $Y=0.18X-2.13$($r=0.994\ 3$)和 $Y=1.31X+1.13$($r=0.996\ 6$)，见图 2。泛醇-10 和泛醌-10 所有定量下限标本的 S/N 均大于 10，变异系数分别为 5.5%和 4.0%，正确度分别为 99.2%和 94.3%。结果表明 LC-MS/MS 测定下，泛醇-10 和泛醌-10 定量下限均可达 1 ng/mL。

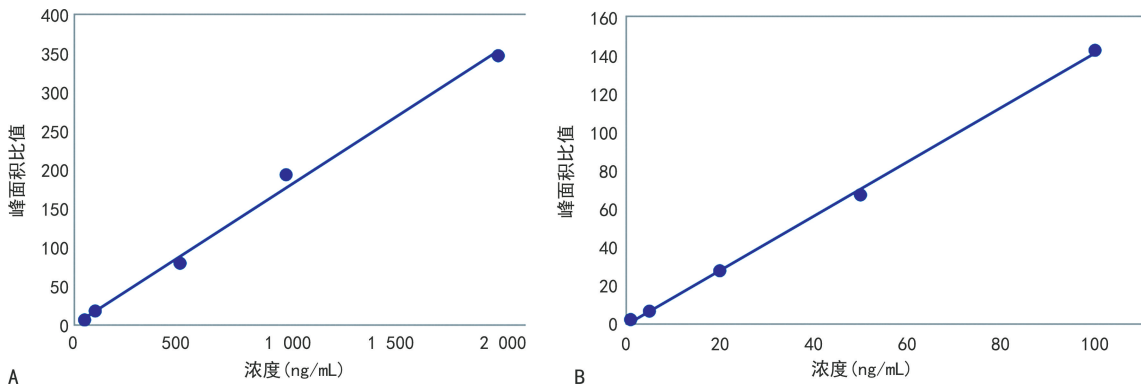
2.1.3　正确度与精密度考察结果　泛醇-10 和泛醌-10 3 个浓度质控标本的正确度为 96.2%～103.9%，变异系数≤9.7%，见表 1。结果表明，本方法满足精密度≤15.0%、正确度在±15.0%的要求，具备较高的正确度和精密度。

2.1.4　稳定性考察结果　低、高 2 个质控浓度的稳定性标本室温放置 4 h、4～8 ℃冷藏 5 d、－20 ℃冷冻放置 30 d 及处理后上清液放置 12 h，泛醇-10 和泛醌-10 的相对偏差分别在－7.29%～9.81%、－6.62%～12.23%内，变异系数分别＜7.3%、8.9%。因此，在上述条件下血浆标本中泛醇-10 和泛醌-10 均较为稳定，存放条件不影响对分析物浓度的准确测定。

2.2　方法学应用　58 份临床血浆标本经 LC-MS/MS 测定后，泛醇-10 和泛醌-10 水平分布见图 3，其中泛醇-10 平均水平为（214.7±55.3）ng/mL（范围 149.8～356.8 ng/mL），泛醌-10 平均水平为（4.1±1.9）ng/mL（范围 2.0～9.5 ng/mL）。

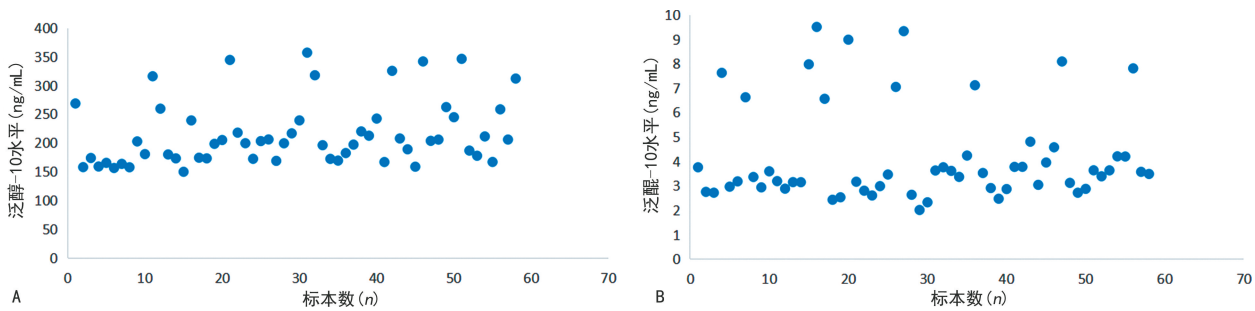
表 1　LC-MS/MS 测定泛醇-10 和泛醌-10 的精密度和正确度

项目	浓度（ng/mL）		变异系数（%）		相对回收率（%）
	加标值	测定值	批内	批间	
泛醇-10	80	81.8	4.0	3.9	102.2
	1 000	993.1	8.1	5.4	99.3
	1 800	1 804.1	1.1	2.6	102.2
泛醌-10	4	4.2	3.0	4.0	103.9
	50	51.8	2.4	3.6	103.7
	90	86.6	9.7	7.4	96.2



注：A 为泛醇-10 的标准曲线；B 为泛醌-10 的标准曲线。

图 2　泛醇-10 和泛醌-10 的标准曲线



注：A 为泛醇-10 水平分布图；B 为泛醌-10 水平分布图。

图 3　58 份临床血浆标本泛醇-10 和泛醌-10 水平分布图

3　讨　论

泛醇-10 和泛醌-10 为脂溶性物质，相对分子质量大，在水中不溶解。本研究采用异丙醇溶解泛醌-10，由于泛醇-10 容易氧化，所以用异丙醇、DMSO 加抗氧化剂溶解泛醇-10。泛醇-10 和泛醌-10 具有强疏水性，本研究选用 50.0 mm 的 C18 短柱，采用高达 99%的甲醇作为有机相进行色谱分离，这与研究报道的 100%甲醇比较接近[1]，既能充分洗涤杂质，又能实现目标化合物地有效分离。在流动相选择上，采用含 0.1%甲酸水－0.1%甲酸和甲酸铵的甲醇（1∶99，v/v），其中甲酸铵用于离子化中提供 $NH4^+$，甲酸和甲酸铵形成离子对试剂，能够保持洗脱体系的稳定。在此体系下泛醇-10 和泛醌-10 及辅酶 Q9 能获得良好的峰型，保留时间分别为 1.07、1.81 和 1.40 min，单个样品分析时间仅为 3.2 min，同以往文献相比缩短了分析时间，实现快速分离[1,10-12]。

大气压化学电离源正离子化方式（$APCI^+$）下辅酶 Q10 的灵敏度明显较低[13]，推测泛醇-10、泛醌-10 比较难形成$[M+H]^+$分子离子峰。本研究采用 ESI^+进行离子化，容易形成加氢以外的加铵分子离子峰，流动相中增加甲酸铵作为增敏剂，泛醇-10、泛醌-10 的$[M+NH4]^+$分子离子峰质谱信号较强，分别为 m/z 882.7、880.7。

尽管有文献报道使用辅酶 Q7[13]和辅酶 Q11[14]作为内标的案例，但在本研究中笔者选择了辅酶 Q9 作为内标物质。辅酶 Q9 仅在 5%的患者样品中可被检测到，且其水平远低于内标水平，因此其对泛醇-10 和泛醌-10 测定的影响可忽略不计[15]。由于泛醇-10 和泛醌-10 在生物体内普遍存在，因此难以获取不含这两种化合物的血浆作为空白基质。本研究采用 4%

的牛血浆白蛋白作为血浆基质的替代品来建立标准曲线。从相对回收率的结果来看，本分析方法展现出良好的精密度和正确度，能够准确地测定人血浆中的泛醇-10 和泛醌-10 水平。

泛醌-10 是辅酶 Q10 的完全氧化态形式，它在自然界中广泛存在于动物、植物和微生物中。泛醌-10 在人体内主要负责提升细胞层面的能量水平，对于维持心脏、肌肉和其他高能量需求组织的正常功能至关重要。此外，泛醌-10 还具有抗氧化作用，可以保护细胞免受自由基的损害。泛醇-10 是辅酶 Q10 的完全还原态形式，它被视为泛醌-10 的活性形式，因为它具有更强的抗氧化能力，可以清除自由基，保护细胞免受氧化应激的损害。在人体内，泛醇-10 和泛醌-10 可以相互转化，这种转化受到多种因素的影响，包括年龄、饮食和生活方式等。随着年龄的增长，人体将泛醌-10 转化为泛醇-10 的能力减弱，因此补充泛醇-10 可能对年长人士有益。此外，泛醇-10 可能具有改善心血管功能、减轻疲劳和提高认知功能等益处。通过血液检测来评估健康人或患者体内泛醇-10 和泛醌-10 的水平，有助于进行营养补充或调整治疗方案。

本研究的方法学评价参考了《液相色谱-质谱临床应用建议》[16]中第 2 部分“方法确认、验证和执行”的相关内容。精密度指标的方法学评价参照了生物样品定量分析方法验证指导原则[17]经过评估，本方法可以准确、精密、快速地测定人血浆中的泛醇-10 和泛醌-10 水平。

根据测得的 58 份临床血浆标本中泛醇-10 和泛醌-10 的平均水平可以看出，两种化合物水平分布较窄且相对稳定。多数标本中泛醇-10 分布在 150.0～220.0 ng/mL，多数标本中泛醌-10 分布在 2.0～4.0 ng/mL，泛醇-10 和泛醌-10 水平分布在极窄的范围内，有利于临床监测和评估。本研究结果显示，约有不到 1/3 标本中泛醇-10 和泛醌-10 水平高于上述分布范围。辅酶 Q10 的合成受到 3 个基因的调控：PDSS1、PDSS2 和 COQ2，辅酶 Q10 也可以通过食物摄入，主要来源为动物内脏、牛肉、鱼肉等食物，因此，个体差异和外源摄入可能是引起二者水平明显偏高的主要原因。

本研究建立了一种准确、精密、快速的 LC-MS/MS 测定人血浆中的辅酶 Q10 的方法。其中，泛醇-10 和泛醌-10 的定量下限均可达 1 ng/mL，保留时间分别为 1.08、1.81 min，单个样品分析时间仅为 3.2 min，适用于大批量的生物样品中辅酶 Q10 的水平监测和临床研究。

参考文献

[1] RUIZ-JIMÉNEZ J, PRIEGO-CAPOTE F, MATA-GRANADOS J, et al. Determination of the ubiquinol-10 and ubiquinone-10 (coenzyme Q10) in human serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry to evaluate the oxidative stress[J]. J Chromatog A, 2007, 1175(2): 242-248.

[2] YOANA R, EMILIO L, JAVIER F A. The use of coenzyme Q10 in cardiovascular diseases[J]. Antioxidants, 2021, 10(5): 755.

[3] ILENIA C, ELISABETTA D, VUSI P D, et al. Role of coenzyme Q10 in health and disease: an update on the last 10 years(2010－2020)[J]. Antioxidants, 2021, 10(8): 1325.

[4] 程梦玲，梁大红，钟燕婷，等. 辅酶 Q(10)对糖尿病小鼠肝肾损伤以及骨骼的影响[J]. 中国临床药理学杂志，2022，38(9)：955-959.

[5] 张仲谋，吴凤明，蔡锋隆，等. 日粮添加辅酶 Q10 对芦花鸡蛋蛋黄中辅酶 Q10 含量、产蛋量和蛋品质的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医，2022，65(8)：94-103.

[6] 张敬锴，张琪，赵英妮，等. 软糖中辅酶 Q10 含量检测方法研究[J]. 现代食品，2023，29(16)：209-212.

[7] 吴鸳鸯，王任，张丽媛，等. 液质联用法同时测定保健食品中维生素 E、维生素 E 乙酸酯和辅酶 Q10[J]. 中国卫生检验杂志，2020，30(5)：533-536.

[8] 王艳. 保健食品中辅酶 Q10 含量的测定[J]. 公共卫生与预防医学，2012，23(4)：103-104.

[9] 丁鸿燕，吕思敏，吴铁. 应用 HPLC 检测田七药材中辅酶 Q10 的含量[J]. 广东化工，2016，43(21)：152-154.

[10] LI L, PABBISETTY D, CARVALHO P, et al. Analysis of CoQ10 in rat serum by ultra-performance liquid chromatography mass spectrometry after oral administration [J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 46(1): 137-142.

[11] SHAH V P, MIDHA K K, FINDLAY J W, et al. Bioanalytical method validation-a revisit with a decade of progress[J]. Pharm Res, 2000, 17(12): 1551-1557.

[12] HANSEN G, CHRISTENSEN P, TUCHSEN E, et al. Sensitive and selective analysis of coenzyme Q10 in human serum by negative APCI LC-MS[J]. Analyst, 2004, 129(1): 45-50.

[13] FINCKH B, KONTUSH A, COMMENTZ J, et al. Monitoring of ubiquinol-10, ubiquinone-10, carotenoids, and tocopherols in neonatal plasma microsamples using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection [J]. Anal Biochem, 1995, 232(2): 210-216.

[14] TESHIMA K, KONDO T. Analytical method for ubiquinone-9 and ubiquinone-10 in rat tissues by liquid chromatography/turbo ion spray tandem mass spectrometry with 1-alkylamine as an additive to the mobile phase[J]. Anal Biochem, 2005, 338(1): 12-19.

[15] LU J, FRANK E L. Measurement of coenzyme Q10 in clinical practice[J]. Clin Chim Acta, 2007, 384(1/2): 180-181.

[16] 中华医学会检验医学分会，卫生计生委临床检验中心. 液相色谱-质谱临床应用建议[J]. 中华检验医学杂志，2017，40(10)：770-778.

[17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020 年版)[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020.

(收稿日期：2024-03-02　修回日期：2024-07-12)