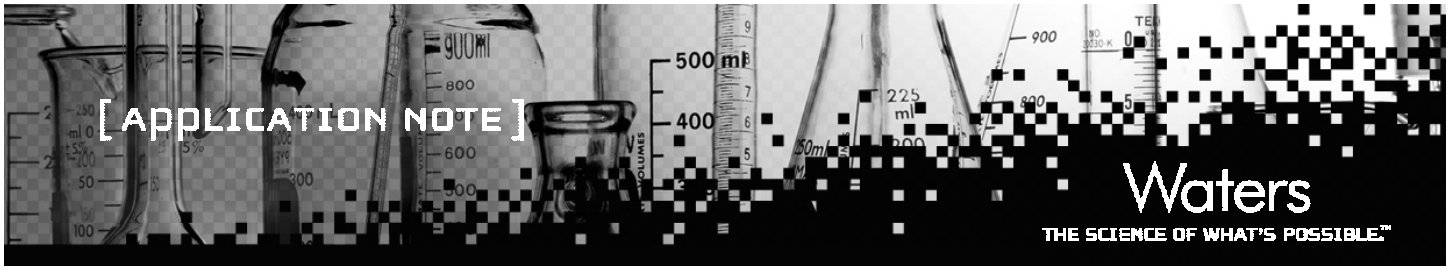


No. 720002316J

ACQUITY UPLC®/PDA/SQD四重極型MS検出器によるコエンザイムQ10の高速・高感度分析

概要

コエンザイムQ10(CoQ10またはユビキノン)はDr. Frederick Craneによって1957年に最初に発見され[1)]、翌年Dr. Karl Folkersによってその化学構造が決定されました[2)]。
CoQ10は体内のどの細胞にも存在する脂溶性ビタミンのような物質で、細胞内でエネルギー生成のキーとなる酵素反応のいくつかに対し補酵素として働きます。
CoQ10はキノン環と10個のイソプレンユニットである炭化水素側鎖から成ります(図1)。この側鎖はメバロン酸経路によってアセチル-CoAから合成されます(メバロン酸経路はコレステロール生合成の最初の段階に用いられます)。キノン環はアミノ酸(チロシンまたはフェニルアラニン)から合成されCoQ10の持つ強力な抗酸化作用に関与します。
CoQ10の還元型はDNA、タンパク、脂質にダメージを与える可能性があるフリーラジカルを除去することができ、心疾患やアルツハイマー病・パーキンソン病などの神経変性疾患を含むあらゆる病気へのリスクを減少させます[3)4)]。CoQ10は健康補助食品になり、心臓病(特に心不全)、歯周病、乳がんなどの治療にも結びついています[5)]。CoQ10の供給には限界がありますが、特に日本ではCoQ10が特定保健用食品に認定されたために、過去数年に渡って需要は劇的に伸びています。現在では世界中で栄養食品として販売されていますが、日本のメーカーがCoQ10の99%を生産し世界に送り出しています。
食事由来のCoQ10、肉、魚、大豆油などに含まれるCoQ10量はとてもわずかです[6)]。CoQ10は体内で合成できるにもかかわらずそのプロセスは他の必須栄養素や運動・病気・医薬品の摂取などに影響されるため、必ずしも必要量に見合うわけではありません。
現在市販されているCoQ10には2通りの異なる製造法があります。1つはタバコの葉からの抽出物(ソラネソル)を用いるソラネソル法で、CoQ10のシス体とトランス体を含みます。もう1つは微生物学的発酵法でトランス体のみを生成します。人体で生成されるのはトランス異性体です。
CoQ10の分析は、純度と品質の管理を目的として主にUV検出器[7)]あるいは電気化学検出器[8)]を用いたHPLC法で行われています。しかしながらこれらの方法は感度が十分ではなく、特異性に欠けています。マススペクトロメトリ(MS)は複雑なマトリクス中の定量にも高い感度を与え、また同定を確実なものにします。
このアプリケーションノートでは、フォトダイオードアレイ検出器とシングル四重極型MS検出器を用いた、高感度・高選択的で迅速・簡便な定量法を紹介します。

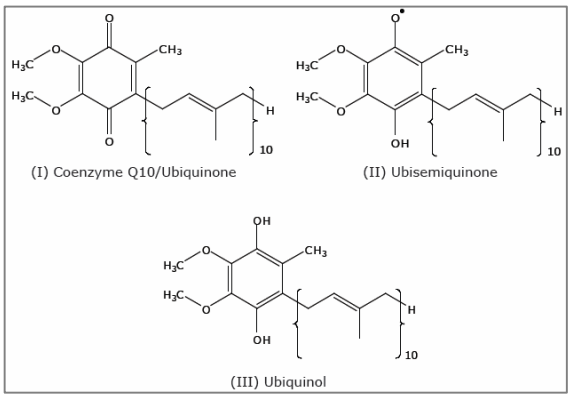


図1. コエンザイムQ10の構造
(Ⅰ:酸化型, Ⅱ:ユビセミキノン;QH, Ⅲ:ユビキノール;QH2)

LC条件
装置　：ACQUITY UPLC® システム　PDA検出器
カラム　：ACQUITY BEH C18 1.7μm 2.1x 50 mm
カラム温度　：30 ℃
移動相A　：メタノール:2-プロパノール(4:1) アイソクラティック
流速　：0.7 mL/min
測定波長　：275 nm
注入量　：5μL
MS条件
装置　：ACQUITY SQD シングル四重極MS検出器
イオン化　：大気圧化学イオン化法(APCI) ポジティブ
コロナ電圧　：5μA
コーン電圧　：45V
脱溶媒温度：400℃
脱溶媒ガス　：800L/hr
ソース温度　：130℃
SIR　：m/z 864.4
ソフトウエア　：MassLynx 4.1, TargetLynxオプション

サンプルの準備：CoQ10を含むカプセル型の栄養補助食品を使用、移動相で希釈し、ろ過して分析に用いました

ACQUITY UPLC® PDA/SQDシステム

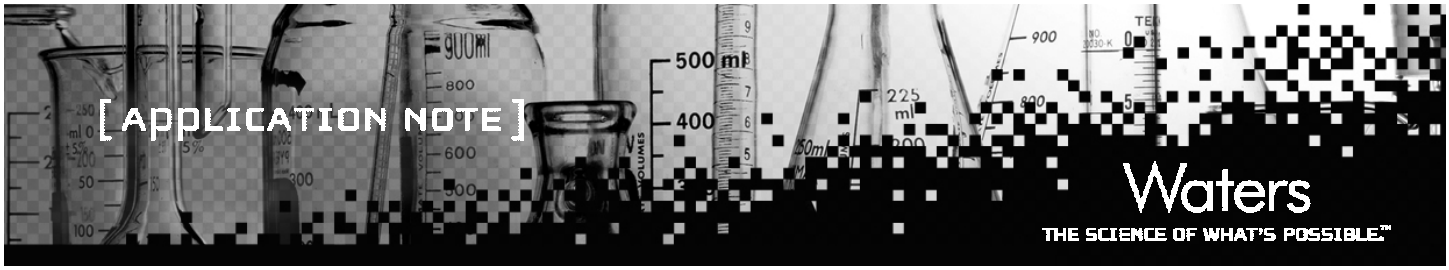
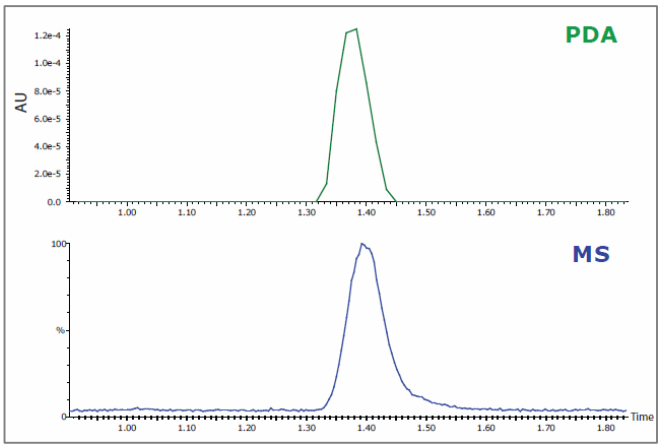


図2.CoQ10標準品(100ppb)のクロマトグラム，PDAとMS検出



CoQ10の標準サンプルはインフュージョンでMS内部に送られ、ACQUITY SQD の機能である"IntelliStart"を使用して自動チューニングとパラメータの最適化が行われました。

プロトン付加イオン[M+H]+であるm/z864.4がSIRでの定量に用いられました。
図2はCoQ10(TR=1.40分)100ppbのSIRクロマトグラムです。ピーク幅はおおよそ10秒です。
PDA検出器でも感度良く検出されていることがわかります。

図3.CoQ10の検量線(1-100ppb)MS検出

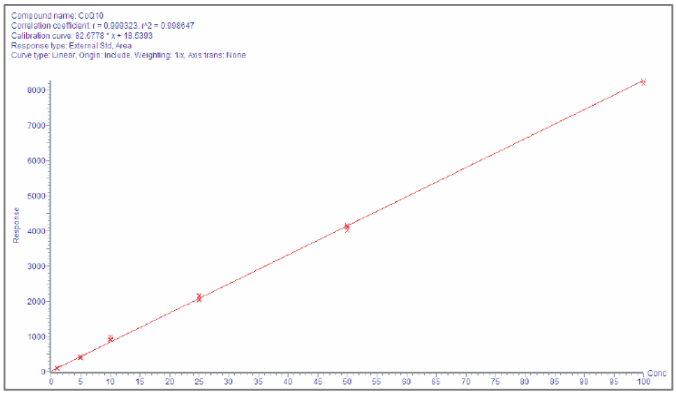
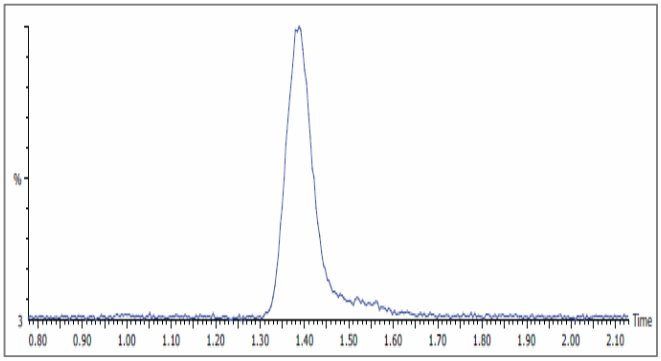


図3にはCoQ10の1-100ppbの検量線を示します。R2=0.999と直線性は良好です。。

図4には栄養補助食品サンプル中のCoQ10を分析したクロマトグラムを示します。定量にAPCI-MS検出を用いることによって、ピークの定性に関する情報も同時に得ることができます。

図4.栄養補助食品中のCoQ10のクロマトグラム，MS検出



参考文献

1. FL Crane, Y Hatefi, RI Lester, C Widmer, *Biochimica et Biophys. Acta.* 1957; 25: 220.
2. Wikipedia website: http://en.wikipedia.org/wiki/Coenzyme_Q10
3. Nutralearn website: http://www.nutrilearn.com/softgel/coqsol.html
4. RT Matthews et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 1998; 95: 8892.
5. N3 Oceanic, Inc. website: http://www.n3inc.com/research/product_ingredients.html
6. MDIdea website: http://www.mdidea.com/products/herbextract/coenzyme/data.html
7. G Rousseau, F Varin, *J Chromatogr Sci.* 1998; 36: 247.
8. Q Wang, BL Lee, C Ong, *J. Chromatogr.* 1999; 726: 297.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™
日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第５小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 カトキチ新大阪ビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡