J. Fd Hyg. Safety
Vol. 26, No. 1, pp. 12~15 (2011)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

HPLC를 이용한 건강기능식품 중 코엔자임 Q10 성분 분석

노기미 · 임동길 · 김미경 · 박경식 · 윤태형 · 홍진 · 박선영 · 정자영*
식품의약품안전청

Analysis of coenzyme Q10 in dietary supplement by HPLC

Ki-Mi No, Donggil Leem, Mi-Gyeong Kim, Kyoung Sik Park, Taehyung Yoon, Jin Hong, Sun-Young Park, and Jayoung Jeong*
Korea Food & Drug Administration
(Received April 27, 2010/Revised August 19, 2010/Accepted February 7, 2011)

ABSTRACT - A method based on high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection has been developed to quantify coenzyme Q10 (CoQ10) in raw materials and dietary supplements. Single-laboratory validation has been performed on the method to determine linearity, selectivity, accuracy, limits of quantification (LOQ) and repeatability for CoQ10. An excellent linearity (r = 0.999) was observed for CoQ10 in the concentration range 15.625~500 μg/mL in dietary supplement. Observed recovery of CoQ10 was found to be between 98.33 and 99.38%. LOQ was found to be 250 μg/mL Repeatability precision for CoQ10 was between 0.15 and 0.21% relative standard deviation (RSD). Further, limited studies showed that some adulterants and degraded material could be satisfactorily separated from CoQ10 and identified.

Key words: Coenzyme Q10, dietary supplements, HPLC, validation

코엔자임 Q10은 1957년 소의 심장에서 발견된 보조효소로 자연계의 거의 모든 호기적 대사를 하는 동·식물체의 조직에서 발견되고 있으며 세포막에 결합되어 있는 전자전달계의 필수적인 지질계 화합물로 특히 심장, 간, 잇몸의 미토콘드리아 내막이나 소포체, 골지체, 라이소좀, 퍼록시좀, 원형질막에 주로 존재한다[1-5]. 코엔자임 Q10의 다른 명칭은 유비퀴논(ubiquinone) 또는 유비데카논(ubidecarenone)이며, "비타민 유사 작용인자"라고 불린다. 비타민의 정의인 "미량의 영양소로 생체 내에서 생합성 되지 않는 것"에는 해당되지 않지만, 비타민과 같은 기능을 하기 때문인 것으로 알려짐에 "비타민Q"으로 불리우기도 한다[6-10]. 코엔자임 Q10은 황색 또는 오렌지색의 결정상 퀴논 화합물(quinone)이며, 냄새나 맛은 없고 지용성 비타민 E, K와 비슷한 화학구조를 가진 지용성 물질로서 물에 거의 녹지 않는다. 코엔자임 Q6~10 등이 있으며 사람, 동물, 식물 등에 존재하는데 사람의 경우 대부분이 코엔자임 Q10이다[10,11] 코엔자임 Q10의 화학 구조에는 '퀴논'과 '이소프렌'이라고 하는 사슬이 공통으로 존재하며 코엔자임 Q10의 뒤의 10이라고 하는 숫자는 이소프렌 단위의 개수를 의미한다. 1개의 이소프렌은 5개의 탄소로부터 되어 있어, 10개의 이소프렌은 50개의 탄소수가 되는 것으로 코엔자임 Q10을 코엔자임 Q50 이라고 표시하기도 한다[5,12,13].

코엔자임 Q10의 인체 내 작용으로는 호흡대사인 전자전달계에서 플라빈단백질과 시토크롬C 사이의 전자전달을 매개하고, 미토콘드리아의 에너지 생산에 관여하는 효소의 전자와 양성자를 운반하는 운반체로 작용하며, 직접적으로 에너지(ATP) 합성에도 관여한다[12-14] 코엔자임 Q10은 항산화, plasma membrane에서 지방 과산화 방지, LDL의 산화 방지, 항고혈압기능, 편두통 치료, 파킨슨병 치료, 그리고 심혈관 질병 치료의 효능이 알려져 있다[13].

코엔자임 Q10은 우리나라 뿐 아니라 일본에서도 2년 연속 건강기능식품 1위, 미국에서도 3위에 랭크되었으며 현재 매년 30%이상 고성장의 방대한 시장을 보유하고 있고, 계속적으로 늘어나는 심혈관계 질환자, 암환자, 면역결핍환자, 노환 등으로 시장의 규모는 해마다 증가추세에 있다[15-20]. 이에 따라 다양한 제품들이 개발되고 있으며, 광범위하고 다양한 매트릭스에서 코엔자임 Q10의 농도를 정확하게 분석하는 분석법을 개발하는 것은 중요하다. 분석법 타당성은 분석에 사용하는 시험법이 시험목적에 적합하고

*Correspondence to: Jayoung Jeong, Nutrition and Functional Food Research Team, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Korea Food & Drug Administration
Tel: 82-43-719-4401, Fax: 82-43-719-4400
E-mail: 0jjy@korea.kr

시험법의 오차가 허용되는 정도라는 것을 과학적으로 입증하는 것으로 선정된 분석법이 재현성이 있고 의도한 목적에 부합되는 신뢰성이 있는 결과를 얻을 수 있다는 것을 증명하는 것이다.

따라서 본 연구에서는 자외선 검출기가 장착된 액체크로마토그래피를 이용하여 분석조건을 최적화하고 마련된 분석법을 밸리데이션 하여 공전 등재를 위한 시험법을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

표준품 및 시약

본 연구에 사용된 코엔자임 Q10 표준품은 Sigma (USA) 사 제품을 사용하였고, 실험에 필요한 모든 시약은 특급시약을 구입하여 사용하였으며 증류수는 Milli-Q ultrapure water purification system (Millipore Co. USA)에 의해 18.2 MΩ 수준으로 정제된 물을 사용하였다.

표준용액 제조 및 표준검정곡선의 작성

코엔자임 Q10 표준품을 10 mg을 정밀히 달아 20 mL용량의 volumetric flask에 취하고 메탄올로 용해 시켜 5 mg/mL 농도로 만들어 표준원액을 메탄올로 희석하여 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 μg/mL 농도가 되도록 만든 후 HPLC에 주입하여 얻은 농도 별 피크면적으로 회귀곡선을 작성하여 검정곡선을 얻었다.

시험용액의 조제

코엔자임 Q10 시료를 분쇄 및 균질화 한 후 일정량을 취하여 에탄올 50 ml를 가하여 30분 동안 진탕 추출하였다. 추출액을 실린지용 필터(0.45 μm)로 여과하여 시험용액으로 하였다.

HPLC 조건의 최적화

코엔자임 Q10의 분석을 위해 사용된 기기는 HPLC waters (USA)를 사용하였다. 분석 칼럼은 C_{18} (shiseido 4.6 mm × 250 mm, 5 μm)이었으며 이동상으로는 Table 1와 같이 메탄올(A)과 에탄올(B)를 사용하여 1.3 ml/min의 유속으로 시료 20 μl를 주입하여 isocratic 조건으로 분석하였다. 정성 및 정량을 위해 사용한 HPLC/PDA의 분석 조건은 Table 1과 같다.

Table 1. HPLC Condition for coenzyme Q10

Column	Shiseido capcellpak C_{18} (4.6 mm ID × 250 mm, 5 μm)	
Mobile Phase	A : MeOH	
	B : EtOH	
Isocratic condition	A: 13	B: 7
Flow rate	1.3 ml/min	
Column temperature	35°C	
Injection volume	20 μl	
Detector	UV 275 nm (190~400)	

분석법 검증

코엔자임 Q10 표준원액을 메탄올에 희석한 후 혼합하여 제조된 코엔자임 Q10 표준용액으로 선택성(selectivity), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection; LOD), 정량한계(limit of quantification; LOQ), 재현성(repeatability), 정밀성(intermediate precision), 정확성(accuracy) 을 측정하였다.

결과 및 고찰

기능성분인 코엔자임 Q10을 신속하고 정확하게 분석하기 위하여 코엔자임 Q10 제조업체의 시험법, 대한약전, 미국약전 및 일본약전의 분석방법을 기울기 용리조건 및 유속 등의 분석조건을 변경하여 새로운 분석 조건을 확립하였다[16,17]. 마련된 시험법 검증을 위하여 검출한계(limit of detection; LOD), 정량한계(limit of quantification; LOQ), 선택성(selectivity), 정밀성(accuracy), 직선성(linearity), 정확성(repeatability)을 측정하였다.

기능성 원료 중에서 선택적으로 분리가 가능함을 확인하

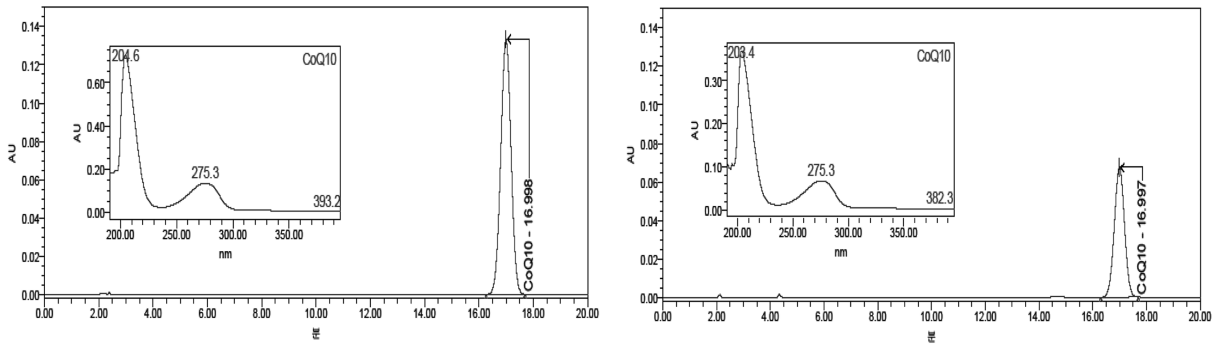

Fig. 1. HPLC chromatogram of coenzyme Q10 in standard and functional material.

기 위하여 표준물질과 기능성원료 50 mg을 취하여 시험법 분석조건을 통하여 HPLC에서 분리되는 크로마토그램과 PDA 스펙트럼을 Fig. 1와 같이 비교하였다. 표준물질에 대한 머무름시간은 16.998분이고, 분리된 피크 정점에서의 PDA 스펙트럼은 특이파장은 275.3 nm로 확인되었다. 코엔자임 Q10의 머무름시간은 16.997분이고, 이때 분리된 피크 정점에서의 PDA 스펙트럼은 275.3 nm로 표준물질과 동일한 머무름시간 및 PDA 스펙트럼을 확인할 수 있었다. Fig. 1에서 알 수 있듯이 개발된 HPLC 방법으로 표준품과 기능성원료에서 간섭 없이 분석할 수 있음을 확인하였다. LOD (limit of detection)는 0.5 μg/ml, LOQ (limit of quantification)는 1 μg/ml로 확인할 수 있었다.

코엔자임 Q10이 검출되는 농도범위를 중간값으로 설정하여 총 6개의 농도 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 μg/mL에 대한 직선성(linearity)과 정량곡선을 구한 다음 상관계수값(r^2)을 검토하였다. 각 농도의 표준용액은 3반복 실험을 하였다. 시험결과 검량선의 R^2은 0.9997이상의 높은 유의수준으로 보였으며, 본 농도를 범위(range)로 설정하였다(Fig. 2).

정밀성을 확인하기 위하여 하루에 실험을 5회 반복 시행하여 반복시험의 재현성(repeatability)과 3일간 실험을 반복 수행하여 분석일자별 정밀도(intermediate precision)를 측정하였다. 반복시험의 재현성은 시험농도의 100%에 해당하는 농도 3개(A,B.C)를 분석법의 전조작을 5회 반복 측정하였으며 %RSD(상대표준편차)는 0.168, 0.149, 0.206%로 나타났다(Table 2). 분석일자의 정밀성(intermediate precision)을 확인하기 위하여 시험농도의 100%에 해당하는 농도를 제조하여 4ºC냉장고에서 보관하면서 0Hour, 24Hour, 48Hour 마다 5회 반복 조작하여 측정한 %RSD의 결과는 각각 0.168, 0.087, 0.261%로 나타났다(Table 3). 이러한 결과는 개발된 분석법이 정량분석에 가능한 재현성을 가지고 있다는 것을 증명해준다고 할 수 있다.

코엔자임 Q10 원료의 매트릭스 영향을 파악하고자 spiking/recovery 방법으로 정확성(accuracy) 을 평가하였다. 표준용액의 검량선 범위 이내에서 취한 검체량에 표준물질인 코엔자임 Q10을 각각 50 μg/g, 100 μg/g, 150 μg/g을 가하여 회수율을 측정하였다. 표준물질을 가한 질량에 따른 회수율을 비교한 결과 99.38, 98.33, 99.23%의 회수율을 보였으며, %RSD는 0.23, 0.47, 0.26%로 나타났다(Table 4).

개발된 방법의 시료 적용성을 알아보기 위하여 시중 유통 중인 개별인정형원료와 제품11건을 구입하여 전처리 후 개발된 HPLC 방법에 적용하여 분석한 결과를 Table 5에 나타내었으며, 모든 원료 및 제품은 자사 기준규격에 적합하였으며 다른 방해물질의 간섭 없이 분리된 것을 확인할 수 있었다.

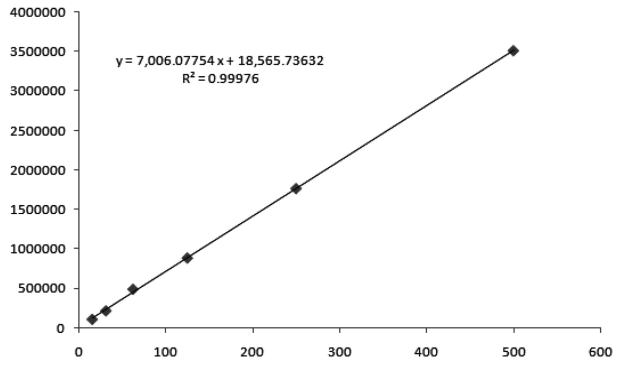

Fig. 2. Coenzyme Q10 calibration curve.

Table 2. Repeatability data of Coenzyme Q10

Treatment	A	B	C
1	91.451	91.543	93.062
2	91.624	91.521	92.575
3	91.482	91.405	92.940
4	91.756	91.770	92.981
5	91.789	91.637	92.795
Mean(μg/g)	91.620	91.575	92.871
S.D.	0.154	0.137	0.192
RSD(%)	0.168	0.149	0.206

Table 3. Intermediate Precision data of Coenzyme Q10

Treatment	0Hour	24Hour	48Hour
1	91.451	92.432	92.362
2	91.624	92.413	92.400
3	91.482	92.352	92.481
4	91.756	92.290	92.645
5	91.789	92.243	92.954
Daily mean(μg/mL)	91.620	92.346	92.568
Inter-day SD	0.154	0.080	0.241
Inter-day RSD(%)	0.168	0.087	0.261
Intra-day RSD(%)		0.54	

Table 4. Accuracy data of Coenzyme Q10

Treatment	Recovery rate(%)		
	A	B	C
1	99.229	98.519	99.153
2	99.682	98.706	99.621
3	99.244	98.751	99.332
4	99.578	97.863	98.999
5	99.171	97.806	99.035
Mean(μg/g)	99.381	98.329	99.228
S.D.	0.232	0.461	0.255
RSD(%)	0.234	0.468	0.257

Table 5. The contents of coenzyme Q10 analysed by newly developed method in raw materials and dietary supplements

No	Type	Standardization	Result
1	Raw material	≥ 99%	99%
2		≥ 98%	98%
3		≥ 99%	99%
4	Ddietary supplement	80~120%	표시량의 98%
5		80~120%	표시량의 105%
6		80~120%	표시량의 90%
7		80~120%	표시량의 87%
8		80~20%	표시량의 83%
9		80~120%	표시량의 106%
10		80~120%	표시량의 104%
11		80~120%	표시량의 97%

요 약

코엔자임 Q10은 우리나라뿐 아니라 여러나라에서 각광받고 있는 건강기능식품 중 하나로 이에 대한 분석법을 마련하고 이에 대한 분석법 검증을 하고자하였다. 분석기기로는 HPLC를 사용하였으며 분석법 검증을 위하여 직선성, 선택성, LOD, LOQ, 정밀성, 정확성을 확인하였다. 또한 현재 유통 중인 개별인정형 건강기능식품의 코엔자임 Q10 함량을 모니터링 한 결과 모든 제품이 적합함을 알 수 있었다. 따라서 확립된 분석 방법은 신속하고 효과적으로 분석하는데 이용될 수 있을 것이며, 개별인정형제품의 코엔자임 Q10이 공전에 등재시 본 연구결과가 시험법으로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본연구는 2009년도 식품의약품안전청 연구개발과제의 연구개발비 지원(09081영기안082)에 의해 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Crane, F.L., Hatefi, Y., Lester, R.L. and Widmer, C. Isolation of a Quinone from Beef Heart Mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 220-221 (1957).
2. Wolf, D. E., Hoffmann, C. H., Trenner, N. R., Anson, D. H., Shunk, C. H., Linn, B. O., McPherson, J. F. & Folkers, K. Coenzyme Q. Structural studies coenzyme Q group. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 47-52 (1958).
3. Alleva R., Scaraarmucci A., Mantera F., Bompandre S., Leoni L., Linarro G.P., The protective role of ubiquinol-10 against formation of lipid hydroperoxdesin human seminal fluids. *Mol Asp Med.* **18**, 221-228 (1997).
4. Raitakari O.T., McCredie R.J., Witting.P, Griffiths KA, Letter J, Sullivan D, Stocker R, CelermajerDS. Coenzyme Q improves LDL resistance to ex vivo oxidation but does not enhance endothelial function in hypercholesterolemic young adults. F*ree Radic. Biol. Med.* **28(7)**, 1100-1105 (2000).
5. Langsjoen P, Langsjoen A, Willis R, Folkers K. Treatment of Essential Hypertension with Coenzyme Q10. *Mole Aspect Med.* **15**, 265-272 (1994).
6. Rozen TR, Oshinsky ML, Gebeline CA, Bradely K, Young WB, Silberstein SD. Open Label Trial of Coenzyme Q10 as a Migraine Preventive. *Cephalalgia.* **22(2)**, 137-41 (2002).
7. Muller T, Buttner T, Gholipour AF, Kuhn W. Coenzyme Q10 supplementation provides mild symptomatic benefit in patients with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters.* **34**, 201-204 (2003).
8. Kendler BS. Recent nutritional approaches to prevention and therpyof cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Nurs.* **12(3)**, 3-23 (1997).
9. Tang PH, Miles MV, deGrauw T, Steele PE, Hershey A, Schroer L, Chuck G, Jones J, Pesce A. Simple and rapid HPLC method with coulometric detection of coenzyme Q10 in human plasma and CSF. *Clin. Chem.* **47**, 256-265 (2001).
10. Tang P. Determination of OTC Dietary Supplement by HPLC with Coulometric detection. *petertang@ccchmc.org.*
11. Wang J. Determination of CoQ10 by HPLC. Nature's Way.
12. Ubidecarenone (Coenzyme Q10) Tablet and Hard Gelatin Capsules. *Magno Humphries Laboratories, Inc.*
13. Coenzyme Q10 (Ubidecarenone) and Vitamin E Assay by HPLC. *Pharmavite LLC*
14. HPLC Determination of Coenzyme Q10 with Oxidative Preparation, *Eurofins*
15. Ullucci P. Simultaneous Measurement of Vitamins A, D, E, K along with CoQ10 and Carotenoids in Multivitamin Tablets, *Infant Formula, and Milk, ESA, Inc.*
16. Ubidecarenone-USP 27, United States Pharmacopeia.
17. Ubidecarenone-JP 13, Japanese Pharmacopeia.
18. Cis CoQ10, trans CoQ10 (purity/assay), *Kaneka*
19. Mattila P. Kumpulainen J. Coenzymes Q9 and Q10: Contents in foods and dietary intake. J Food compos Anal. **14**, 409-417 (2001).
20. Abdelbarr M. Coenzyme Q10 (Ubidecarenone) in Nutritional Supplements, *Tishcon.*