

高效液相色谱-质谱法测定特定用途保健药品中的褪黑激素*

陈文锐 陈永红 胡国昌

(国家进口食品卫生监督检验中心 广州 510405)

提 要 采用 HPLC-MS 联用法测定了具有改善睡眠等特定功能的保健药品中的褪黑激素。利用质谱库检索和二极管阵列检测光谱图鉴定“松果体素”药品中的褪黑激素,以甲醇-水(70:30)为流动相,检测波长为 275nm。用外标法进行定量分析,方法最低检测限为 0.2ng。

关键词 高效液相色谱-质谱联用法,褪黑激素,保健药品

分类号 O658

1 前言

褪黑激素(melatonin)作为在动物体内起重要作用的一种激素,在国外已日益受到广泛的关注。研究表明,人到中年以后适当补充褪黑激素,可以治疗睡眠障碍,延缓衰老,降低血脂,改善性生活等^[1]。目前国外已有大量含褪黑激素的口服片剂或胶囊保健品,近年也有不少这类药品进口到中国,而且进口量和消费量都呈日益增加的趋势。但由于对褪黑激素的应用尚处于研究阶段,误用或滥用可能会造成不良后果,因此,不论从卫生监督还是从质量管理的角度看,研究和建立灵敏、快速、准确的测定保健品中褪黑激素的方法有着重要的现实意义。

目前国内在这方面的研究甚少,国外测定褪黑激素的方法也多限于血液、尿液中的测定^[2-7],而对于这类保健品中褪黑激素的测定尚未见报道。本研究中我们采用 HPLC-MS 对该类保健品中的褪黑激素进行定性、定量测定。

2 实验部分

2.1 试剂

褪黑激素, Sigma 公司出品。取 20mg 标样溶于甲醇并定容到 25mL 作为储备液,工作液浓度为 5~50mg/L。甲醇,分析纯,使用前用 0.45 μ m 滤膜过滤。水,用 Mill-Q 纯水装置纯化。

2.2 仪器及其条件

HPLC 仪器: HP 1090, 具二极管阵列检测器; 分析柱: Hypersil ODS, 100mm \times 2.1mm; 预柱: C₁₈, 20mm \times 5mm; 流动相: 甲醇-水(70:30); 定量检测波长: 275nm; 流速: 0.8mL/min。质谱仪: HP 5989B, 离子源: EI, 温度 150 $^{\circ}$ C; 四极杆温度: 100 $^{\circ}$ C; 电子能

量: -70eV; 电子放大器电压: -1.73kV。粒子束接口: HP 59980B。脱溶剂室温度: 55 $^{\circ}$ C; 氦气压力: 310kPa; 真空度: 106Pa。

2.3 样品制备

由于这类保健品多制成口服片剂或胶囊,其基质一般为微晶纤维素,不干扰测定,因此样品经简单处理即可。即:取数颗片剂或胶囊样品充分研磨混匀,称取约 100mg 样品于离心管中,加入 10mL 甲醇后盖紧,于涡流混合器上振荡 1min,放置 1h(过夜浸泡更好),偶尔振荡一下。然后于离心机以上以 3500 r/min 的速率离心 10min,取澄清液 1mL 稀释到合适的倍数(视含量而定)。进样量 5~10 μ L。

2.4 萃取效果试验

将上述离心管中的溶液倾出,残渣中加入少量甲醇,再离心,倾出清液,合并两次倾出液并定容到一定体积,用 HPLC 测定褪黑激素总量;最后用 5mL 甲醇浸泡残渣(将沉淀的残渣搅匀),放置过夜,按上述方法测定第二次浸泡液中褪黑激素含量。通过两次含量的比较来评价萃取效果。

2.5 精密度试验

称取 5 份经充分研磨混匀的样品按 2.3 项方法测定,计算出标准方差和变异系数。

3 结果和讨论

3.1 色谱条件的选择

文献报道一般采用缓冲溶液-乙腈(或甲醇)作为流动相。由于 HPLC-MS 联用不允许使用非挥发性的缓冲溶液,因此我们选用常见的甲醇-水作为流动相,同样可以得到满意的色谱图(见图 1)。褪黑激素的保留时间为 2.46min,在此条件下可与杂质峰完全分离。

* 本文收稿日期:1997-05-24,修回日期:1997-09-01

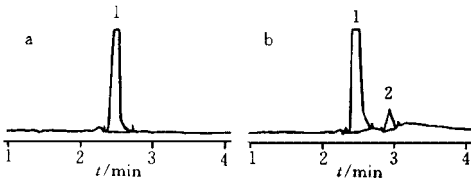


图 1 褪黑激素标准品(a)和样品(b)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of melatonin standard (a) and sample (b)

1. 褪黑激素(melatonin, a. 2.460 min, b. 2.461 min),
 2. 杂质(impurity, 2.933 min).

3.2 褪黑激素组分的鉴定

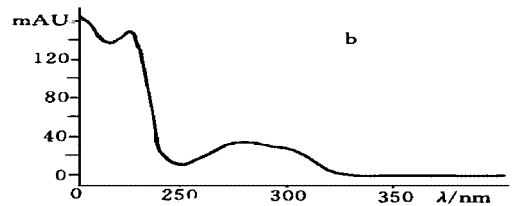
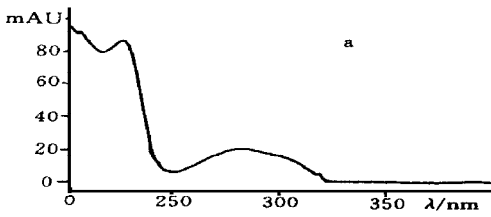


图 2 褪黑激素标准品(a)和样品(b)的在线 UV 谱图

Fig. 2 UV spectra of melatonin standard (a) and sample (b)

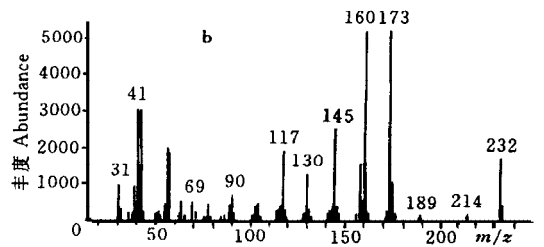
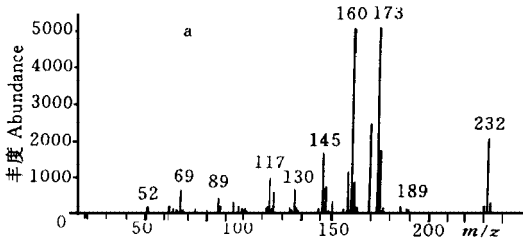


图 3 褪黑激素质谱图(a)及对照谱图(b)

Fig. 3 Mass spectra of melatonin in sample (a) and library search result (b)

3.3 定量分析特性

3.3.1 标准曲线 在 5~ 50mg/L 质量浓度范围内作标准曲线(进样 5μL)(见图 4),测得相关系数为 0.999 85,回归方程为 $Y = 32.27X - 10.27$ 。

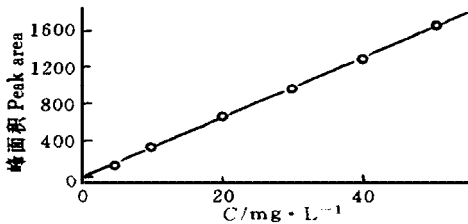


图 4 褪黑激素标准曲线

Fig. 4 Calibration curve of melatonin

二极管阵列检测器可提供在线光谱图,这对于在紫外区有特征吸收峰的化合物的鉴定有很大帮助,而 HPLC-MS 联用技术的成熟,则使非挥发性化合物的分离和鉴定变得简单,我们将这两者结合起来对样品中的褪黑激素组分进行确认。图 2 的 a 和 b 分别为褪黑激素标准品和样品的在线紫外光谱图,在 225nm 和 275nm 附近各有一个吸收峰,与文献值(223nm 和 278nm)相符^[8],而且样品和标准品的在线紫外光谱图完全一致。图 3 为样品组分的质谱图及从谱库检索到的对照图。m/z 232 为分子离子峰, m/z 189, 173, 160, 145 为主要的碎片离子峰。

3.3.2 精密度 对一个样品进行 5 次测定的结果见表 1。

表 1 精密度测定(n= 5)(mg/g)

Table 1 Precision of the method (n= 5)(mg/g)			
测定值 Found	平均值 \bar{X}	标准偏差 SD	变异系数 CV(%)
8.40, 8.52, 8.75, 8.67, 8.45	8.56	0.1207	1.5

3.3.3 最低检测限 以 0.2mg/L 浓度进样 5μL,从得到的色谱数据计算褪黑激素最低检测限约为 0.2ng。

3.3.4 样品萃取效果试验 分别测定两次浸泡液中(参见 2.4 项)褪黑激素的含量并计算萃取比例,第一次的萃取率为 98.7%,第二次为 1.3%,说明

1 h 的浸泡已将褪黑激素基本萃取出来。

4 结论

本文建立的快速、准确地测定保健药品中褪黑激素的方法完全能满足日常检测的要求, 从样品处理到 HPLC 测定, 整个分析步骤比较简单。当然, 如果样品基质较为复杂, 则前处理方法需视具体样品而作调整。

参 考 文 献

1 胡国昌. 中国进口食品卫生通讯(内部材料). 1996. 12: 22

2 Mills M H, King M G, Keats N G et al. J Chrom

matogr, 1986, 377: 350-355

3 Greiner A C, Chan S C. Science, 1978, 199: 83-84

4 Alfred J L, Markey S P. Science, 1978, 201: 741-743

5 Cattabeni F, Koslow S H, Costa E. Science, 1972, 178: 166-168

6 Lee C R, Esnaud H. Biomed Environ Mass Spectrom, 1988, 15(5): 249-252

7 Hall F, Tengerdy C, Morita M et al. Curr Eye Res, 1985, 4(8): 847-850

8 Martha W, Susan B, Lorraine Y S et al. The Merck Index. Ninth Edition. USA: MERCK & CO. INC, 1976. 5635

The Determination of Melatonin in Health-Caring Medicine for Specific Purposes by High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

Chen Wenrui, Chen Yonghong and Hu Guochang
 (The National Centre of Import Food Hygiene Supervision & Inspection of P. R. China, Guangzhou, 510405)

Abstract A rapid and precise method for the determination of melatonin in health-caring medicine for specific purposes, based on high performance liquid chromatography-mass spectrometry, has been developed. The compound was identified using DAD UV spectrum and mass spectrum. Hypersil ODS column, 100mm × 2.1mm i. d., and mobile phase of methanol/water(70: 30, V/V) were used for the assays. The quantitation was performed with external standard, and detection at 275nm. The calibration curve of melatonin was linear in the range of 5-50mg/L and the detection limit was ca. 0.2ng.

Key words high performance liquid chromatography/mass spectrometry, melatonin, health-caring medicine

欢迎订阅《分析化学文摘》

《分析化学文摘》创刊于 1960 年 4 月 15 日, 是我国唯一全面报道分析化学各分支的国内外文献的检索刊物, 每次全国科技检索刊物评比均获奖, 在国内深受用户的欢迎。

《分摘》的栏目有: 一般问题、无机化学、有机化学、临床和生物化学、药物化学、食品、农业、环境化学及仪器和技术。收集文献范围包括国内外期刊[含国外 1600 余种和国内公开发行的 1 000 余种(其中包括高等院校学报 510 余种)]、专利、会议文集、论文汇编、科技报告、书籍和标准。每年收集文摘 15 000 余条(含中文 3 000 余条), 故有“订一得千获万”之称。《分摘》以 1985 年收录中文文献起为第 1 卷, 月刊, 每期 20 万字, 每年第 12 期为年度主题索引。

《分摘》是各行各业具有分析化学、理化检验、临床化验工作的研究单位、大专院校、企业厂家、医院、防疫站、环保站所、图书馆、情报所等资料部门的必备信息资料检索工具, 也是从事分析化学的工程师、化验师、科研及教学人员和学生的必用检索工具。

定价: 1999 年月定价 18.80 元, 年定价 225.60 元; 邮发代号: 78—52; 国内统一刊号: CN51—1220/O6。杂志社通讯处: 重庆市 2104 信箱(邮编 400013); 电话: (023)63500828。

订购处: 全国各地邮局, 本社发行处(可以九折优惠)。