

对USP褪黑素各论分析方法和杂质方法进行提高通量和减少溶剂浪费的现代化改进

Jinchua Yang, Paul D. Rainville

Waters Corporation

摘要

褪黑素是一种神经激素，可调节人类的睡眠周期。它作为膳食补充剂购买方便，常用于缓解与睡眠相关的疾病。近期的数据表明，儿童摄入褪黑素的事件数量急剧增加。在膳食补充剂产品中，也报告了远高于标签值的褪黑素含量。为协助褪黑素生产过程的质量控制，我们在Waters Arc™ HPLC系统上使用XBridge BEH™ C₁₈色谱柱(2.5 μm, 4.6 mm × 75 mm)开发了USP褪黑素各论方法的现代化版本。液相色谱条件根据USP <621>指导原则进行了适当调整，使分离性能满足USP系统适应性要求，缩短了运行时间，还减少了溶剂浪费。

优势

- 5分钟等度运行，即可分析褪黑素
- 13分钟梯度洗脱程序，即可定量杂质
- 满足所有系统适应性要求

简介

褪黑素（N-乙酰基-5-甲氧基色胺）是一种由哺乳动物松果体产生的神经激素。褪黑素在脊椎动物的睡眠周期中发

挥重要作用，因此它常被用于缓解与睡眠相关的疾病，例如睡眠障碍、焦虑和时差反应¹。褪黑素有多种形式的膳食补充剂，包括风味液体、咀嚼片、软胶囊、胶囊和软糖，可作为非处方药购买。最近有报道称，从2012年到2021年，儿童摄入褪黑素的事件数量增加了530%，这些事件与287例重症监护病房收治和2例死亡有关²。近期的研究还发现，某些膳食补充剂中的褪黑素含量远高于标签声称值。在一种膳食补充剂和一种软糖中分别发现褪黑素含量高达标示值的478%和347%^{3,4}。这引起了人们对含褪黑素膳食补充剂的质量和安全的担忧。膳食补充剂制造商需要改进质量控制，确保标签说明准确无误。美国药典(USP)褪黑素各论规定了褪黑素含量和杂质的行业标准⁵。本应用纪要的目的是在Waters Arc HPLC系统和Waters 2998 PDA检测器上使用XBridge BEH C₁₈ (2.5 μm, 4.6 mm × 75 mm)色谱柱对USP方法进行现代化改进。

实验

实验采用美国药典推荐的标准品和样品溶液制备以及液相色谱(LC)条件，并稍作调整⁵。USP褪黑素RS、5-甲氧基色胺(5-MT)购自Sigma-Aldrich (美国宾夕法尼亚州阿伦敦)。

缓冲液：0.5 g/L磷酸二氢钾水溶液。用磷酸将pH调整至3.5，然后过滤。

标准品溶液：含0.1 mg/mL USP褪黑素RS的流动相溶液（乙腈和缓冲液，22/78 v/v）。

系统适应性溶液：含0.1 mg/mL USP褪黑素RS和0.02 mg/mL 5-MT（褪黑素相关化合物A）的流动相（乙腈和缓冲液，22/78 v/v）。

样品溶液：含0.1 mg/mL褪黑素的流动相溶液（乙腈和缓冲液，22/78 v/v）。

液相色谱条件

系统： 配备2998 PDA检测器的Arc HPLC系统

样品定量环： 50 μL（标准）

色谱柱： XBridge BEH C₁₈色谱柱, 130 Å, 2.5
 μm, 4.6 mm × 75
 mm (P/N: 186006038)

色谱柱预加热器：	否（旁路）
样品瓶：	2 mL螺纹颈口玻璃样品瓶（ P/N：186000273），带螺口盖（ P/N：186000305）
温度：	30 °C
样品管理器清除溶剂：	乙腈和缓冲液(22:78 v/v)
样品管理器清洗溶剂：	乙腈和水(22:78 v/v)
密封清洗溶剂：	甲醇和水(1:1 v/v)
进样体积：	2.0 µL
UV波长：	222 nm
软件：	Empower 3 CDS

用于分析

流动相（等度）：	乙腈和缓冲液(22:78 v/v)
运行时间：	5.0 min

用于杂质

流动相A：	乙腈
流动相B：	缓冲液（0.5 g/L磷酸二氢钾水溶液，pH 3.5）

梯度洗脱程序：

见表1。

运行时间：

13.0 min

表1

时间(min)	流速 (mL/min)	流动相A (%)	流动相B (%)	曲线
初始	1.00	22	78	初始
3.50	1.00	22	78	6
7.50	1.00	80	20	6
8.50	1.00	80	20	6
8.75	1.00	22	78	6
13.00	1.00	22	78	6

结果与讨论

USP方法的现代化改进

USP褪黑素各论中详细说明了褪黑素的测定和杂质检测方法。本研究在Arc HPLC系统上实施这些方法，并根据USP允许的调整指导意见进行了细微调整⁶。使用2.5 μm粒径的XBridge BEH C₁₈色谱柱，因为其每单位长度的分离效率高于USP各论中的5 μm颗粒色谱柱。色谱柱的柱长调整为75 mm，目的是保持与USP各论中的L/dp（色谱柱柱长/粒径比率）相同。USP各论建议使用乙腈与缓冲液组成的流动相（25:75，v/v），但研究中发现，需要将流动相组分小幅调整至22:78（乙腈和缓冲液），才能满足相关化合物A（5-MT）和褪黑素的RRT（相对保留时间）系统适应性要求（分别为0.4和1）。这种细微的组成调整在USP指导原则允许的调整限度内（流动相中次要组分的调整幅度小于或等于10%绝对值，或相对调整幅度在30%以内）。根据USP推荐的5 μm色谱柱流速1.0 mL/min，2.5 μm粒径色谱柱（具有相同的内径）缩放后的流速为2.0 mL/min。但是，我们根据对分离性能的研究（见表2），为分析选择了1.0 mL/min的流速，因为在1.0~2.0 mL/min的流速范围内色谱柱分离效率（理论塔板数）最佳。请注意，将色谱柱连接到进样器时，绕过了柱温箱内的预加热管路。对于这款柱长为75 mm的色谱

柱(4.6 mm × 75 mm)而言,这样做有助于减少柱外谱带展宽,可提高分离效率。图1和图2展示了在等度洗脱条件(用于分析)和梯度洗脱条件(用于杂质)下,褪黑素和相关化合物A (5-MT)的色谱图。等度洗脱的运行时间为5分钟,梯度洗脱的运行时间为13分钟。这些运行时间约为USP方法运行时间的一半。较短的运行时间以及相关的溶剂浪费减少将缩短分析周转时间并降低运行成本。

流速 (mL/min)	保留时间(min)		理论塔板数		相对保留时间 (5-MT/褪黑素)	分离度 (5-MT/褪黑素)	压力 (psi)
	5-MT	褪黑素	5-MT	褪黑素			
1.00	1.225	3.100	3058	7202	0.40	16.2	2500
1.20	1.030	2.605	2798	6672	0.40	15.6	3000
1.40	0.886	2.248	2791	6574	0.39	15.6	3530
1.60	0.784	1.988	2774	6555	0.39	15.6	4070
1.80	0.705	1.792	2629	6278	0.39	15.2	4600
2.00	0.636	1.618	2430	5929	0.39	14.7	5120

表2.流速对褪黑素及其相关化合物A (5-MT)分离的影响。

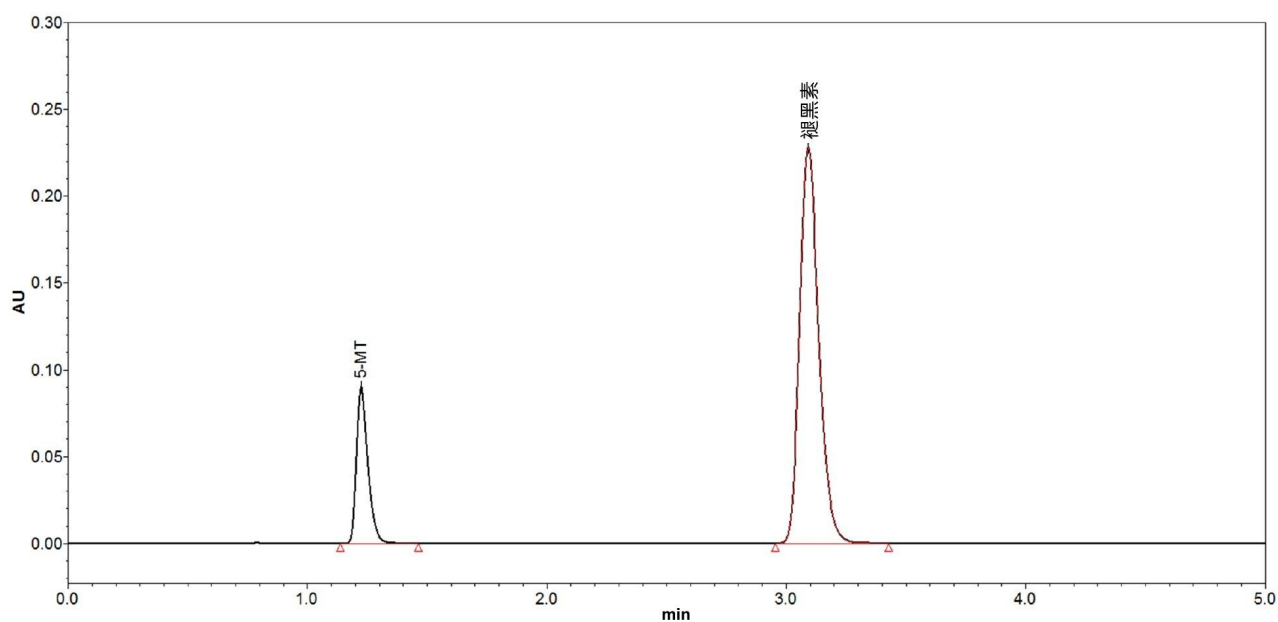


图1.在等度洗脱条件下(用于褪黑素分析)得到的系统适应性溶液(含0.1 mg/mL褪黑素和0.02 mg/mL 5-MT的流动相)的色谱图。

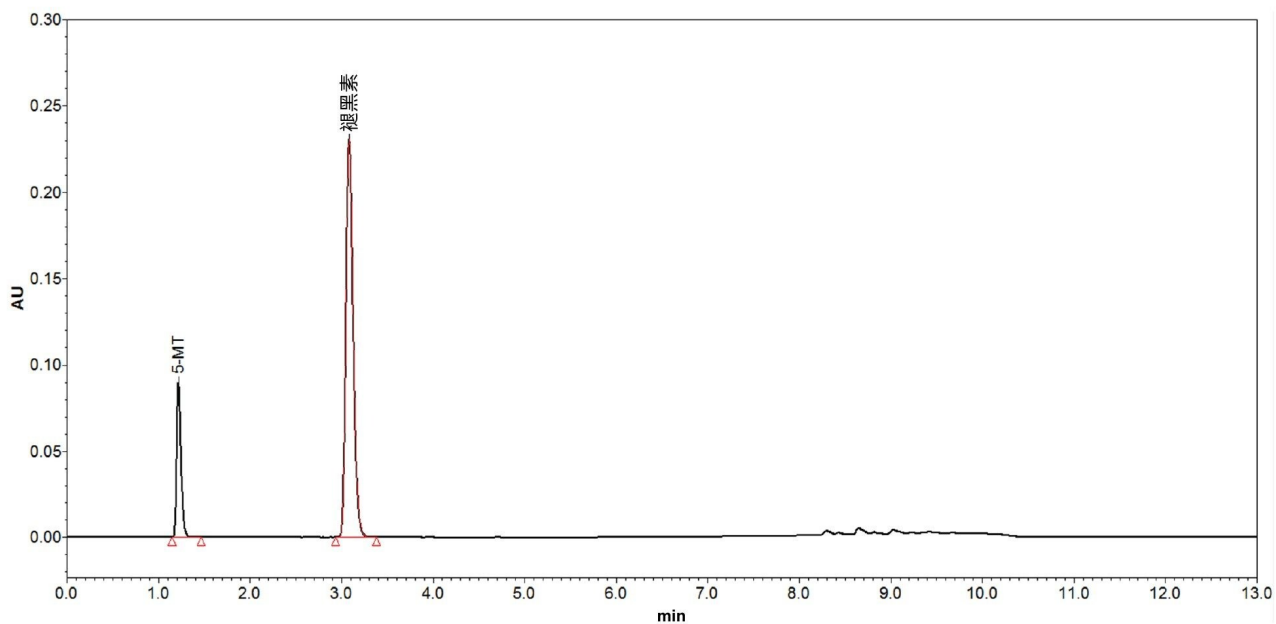


图2. 在梯度洗脱条件下（用于杂质）得到的系统适应性溶液（含0.1 mg/mL褪黑素和0.02 mg/mL 5-MT的流动相）的色谱图。

系统适应性

USP褪黑素各论规定了分析方法和相关化合物的系统适应性要求。这些要求包括：相关化合物A与褪黑素的RRT、相关化合物A与褪黑素之间的分离度，以及褪黑素的相对标准偏差(RSD)（参见表3）。表4展示了在使用XBridge BEH C₁₈色谱柱(2.5 μm, 4.6 mm × 75 mm)的Arc HPLC系统上分析褪黑素及其相关化合物A (5-MT)的系统适应性性能和重复性结果。褪黑素峰面积的RSD为0.11%。RRT值、分离度和重复性均符合USP的系统适应性要求（参见表3）。

参数	USP系统适应性要求	Arc HPLC性能
RRT	5-MT: 0.4; 褪黑素: 1.0	5-MT: 0.4; 褪黑素: 1.0
分离度	不小于4	16
RSD	不超过2.0%	0.11%

表3. USP系统适应性要求和Arc HPLC性能。

进样编号	褪黑素相关化合物(5-MT)				褪黑素			
	保留时间 (min)	峰面积 ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	USP理论塔板数	相对保留时间	保留时间 (min)	峰面积 ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	USP理论塔板数	分离度
1	1.224	303580	3090	0.40	3.089	1264991	7221	16.15
2	1.225	303567	3081	0.40	3.091	1268360	7257	16.18
3	1.225	302870	3075	0.40	3.091	1267848	7199	16.18
4	1.226	303539	3070	0.40	3.098	1268049	7247	16.23
5	1.227	303544	3090	0.40	3.101	1268199	7217	16.20
平均RSD	1.2254	303420	3081	0.40	3.094	1267489	7228	16.19
RSD (%)	0.09	0.10	0.29	0.08	0.17	0.11	0.32	0.18

表4. 在配备XBridge BEH C₁₈ 2.5 μm 4.6 mm \times 75 mm色谱柱的Arc HPLC系统上获得的系统适应性性能和分离重复性。

结论

本应用纪要展示了使用Waters Arc HPLC系统和XBridge BEH C₁₈色谱柱(130 Å, 2.5 μm , 4.6 mm \times 75 mm)对USP褪黑素各论方法进行的现代化改进。液相色谱条件根据USP指导原则进行了适当调整。褪黑素及其相关化合物A的分离结果符合所有USP系统适应性要求, 包括相对保留时间、分离度和相对标准偏差。使用2.5 μm 颗粒XBridge BEH C₁₈色谱柱(4.6 mm \times 75 mm)可缩短运行时间并减少溶剂消耗, 从而缩短周转时间, 降低运营成本。

参考资料

1. Auld F, Maschauer EL, Morrison I, Skene DJ, Riha RL. Evidence for the Efficacy of Melatonin in the Treatment of Primary Adult Sleep Disorders. *Sleep Med Rev.* 2017;34:10–22. doi: [10.1016/j.smr.2016.06.005](https://doi.org/10.1016/j.smr.2016.06.005) <<https://doi.org/10.1016/j.smr.2016.06.005>> .
2. Lelak K, Vohra V, Neuman MI, Toce MS, Sethuraman U. Pediatric Melatonin Ingestions—United States, 2012-2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2022;71(22):725-729. doi: [10.15585/mmwr.mm7122a1](https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7122a1) <<https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7122a1>> .
3. Lauren A.E. Erland, Praveen K. Saxena. Melatonin Natural Health Products and Supplements: Presence of Serotonin and Significant Variability of Melatonin Content. *J Clin Sleep Med.* 2017 13(2):275–281. doi: [10.5664/jcsm.6462](https://doi.org/10.5664/jcsm.6462). <<https://doi.org/10.5664/jcsm.6462>>
4. Cohen P.A., Avula B., Wang Y-H, Katragunta K., Khan I. Quantity of Melatonin and CBD in Melatonin Gummies Sold in the US. *JAMA.* 2023; 329(16): 1401–1402. doi: [10.1001/jama.2023.2296](https://doi.org/10.1001/jama.2023.2296) <<https://doi.org/10.1001/jama.2023.2296>> .
5. Melatonin Monograph. United States Pharmacopeia, Docid: GUID-454646BE-F1DF-458C-9011-1FBBCFEFE5BC_4_en-US, 2023.
6. Chapter 621 Chromatography. United States Pharmacopeia, Docid: GUID-6C3DF8B8-D12E-4253-A0E7-6855670CDB7B_7_en-US, 2023.

特色产品

Arc HPLC系统 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/products/chromatography/chromatography-systems/arc-hplc-system.html>>

2998光电二极管阵列(PDA)检测器 <<https://www.waters.com/1001362>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007978ZH, 2023年6月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)