

USP褪黑素含量测定和杂质各论方法的现代化(II) - 膳食补充剂的分析性能和分析

Jinchua Yang, Paul D. Rainville

Waters Corporation

摘要

褪黑素的USP含量测定和杂质分析程序已经在Arc™ HPLC™系统上完成优化，该系统与Waters™ 2998 PDA检测器联用，使用XBridge™ BEH™ C₁₈ (2.5 μm, 4.6 mm x 75 mm)色谱柱。在本应用纪要中，我们研究了现代化USP褪黑素含量测定方法的分析特性。该方法在特异性、线性、灵敏度、准确度和精密度（重复性）方面表现均有出色表现。我们对六种代表性膳食补充剂应用了该含量测定方法，结果显示褪黑素含量超标3%~42%。这种现代化的USP褪黑素含量测定方法适用于对补充剂中的褪黑素进行快速、经济的分析。

优势

- 快速、经济地分析膳食补充剂中的褪黑素
 - 可靠、准确地测定各种剂型的补充剂中的褪黑素
-

简介

面对近期公众对于儿童摄入褪黑素增加的担忧^(1,2)，此处展示了一例美国药典(USP)褪黑素含量测定和杂质分析方法步骤³现代化的成功案例，我们将Waters Arc HPLC系统与2998 PDA检测器联用，使用XBridge BEH C₁₈ (2.5

μm , 4.6 mm x 75 mm)色谱柱和经过优化的LC条件⁴。在本应用纪要中，我们将使用不同剂型（即液体、软胶囊、片剂和胶囊），不同褪黑素含量（1~10 mg/份）的代表性膳食补充剂样品，进一步展示USP各论方法步骤的分析性能和适用性。

实验

褪黑素（USP褪黑素RS）和5-甲氧基色胺(5-MT)购自Sigma-Aldrich（宾夕法尼亚州阿伦敦）。膳食补充剂购自在线商店。这些产品来自5个不同品牌，分为四种剂型（片剂、胶囊、软胶囊和液体），褪黑素含量在1 mg至10 mg/份的范围内（样品信息见表1）。

样品代码	产品说明	剂型	标示量 (mg/份)	其他成分
A	含褪黑素、天然浆果风味及其他天然香料的儿童助眠液	液体	1	甘油，天然香料
B	超强睡眠，多重功效	软胶囊	10	米糠油、明胶、甘油、水、向日葵卵磷脂、蜂蜡、天然香料、蔬菜汁、二氧化钛、麦芽糖糊精、洋红
C	借助褪黑素和天然橙子风味入睡	咀嚼片剂	5	果糖、糖、天然香料、改性纤维素、有机酸、蜂蜜、阿拉伯树胶、硬脂酸镁、二氧化硅、甜叶菊提取物、天然色素、瓜尔豆胶。
D	褪黑素+洋甘菊和薰衣草	片剂	2	微晶纤维素、交联羧甲基纤维素钠、磷酸钙、麦芽糖糊精、玉米淀粉、硬脂酸镁、二氧化硅、聚乙烯醇、聚乙二醇、二氧化钛、滑石粉、食用色素。
E	褪黑素	胶囊	5	微晶纤维素、硬脂酸镁
F	褪黑素、覆盆子风味与其他天然香料	咀嚼片剂	3	糖、天然香料、硬脂酸、蔬菜硬脂酸镁、水果粉、植物纤维素。

表1.样品信息

标准品和流动相制备

标准品溶液：含有0.1 mg/mL USP褪黑素RS的甲醇溶液。

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

样品前处理

片剂在使用前先研磨成细粉。胶囊（细粉）和软胶囊（半固体）中的内容物可直接使用。清洁胶囊和软胶囊的外壳并称重，从而计算出内容物的实际分量（从胶囊或软胶囊的毛重中扣除外壳的质量）。使用10粒胶囊的平均分量进行分析。称取适量的样品（记录精确至0.0001 g），使褪黑素的最终溶液在0.04~0.1 mg/L的范围内，加入25 mL容量瓶中。在加标实验中，将等份褪黑素标准溶液（称重精确至0.0001 g）加入容量瓶中。向容量瓶中加入15 mL甲醇（LC级，Fisher Scientific），然后涡旋混合至少1 min。然后再加入甲醇至25 mL。将样品在室温下放置30 min，然后混合，取等份试样（约1.5 mL），在2000 rcf下离心5 min。取一份（约1 mL）澄清的上清液转移至LC样品瓶中进行LC分析。按照USP褪黑素各论方法的建议，使用单点校准对样品进行定量分析。

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 μ L（标准）
色谱柱：	XBridge BEH C ₁₈ 色谱柱, 130 Å, 2.5 μ m, 4.6 mm × 75 mm(P/N: 186006038)
色谱柱预加热器：	无（旁路）
温度：	30 °C
样品管理器清除溶剂：	乙腈与缓冲液的混合溶液(22:78 v/v)
样品管理器清洗溶剂：	乙腈/水(22:78 v/v)
密封清洗溶剂：	甲醇/水(1:1 v/v)
进样体积：	2.0 μ L
流动相（等度）：	乙腈与缓冲液的混合溶液(22:78 v/v)
运行时间：	5.0 min

UV检测波长:	通过参比(310~410 nm)补偿UV吸光度 (波长222 nm, 分辨率4.8 nm)
软件:	Empower 3 CDS

结果与讨论

分析性能

我们在之前的纪要“通过对USP褪黑素各论中的含量测定和杂质分析方法进行现代化以提高通量并减少溶剂浪费”中已经指出,在优化条件下进行HPLC分析可以满足USP系统适用性要求,包括褪黑素及其相关化合物A (5-MT)在含量测定(在等度洗脱条件下)和杂质(在梯度洗脱条件下)分析中的相对保留时间、分离度和重复性⁴。在本应用纪要中,我们重点介绍了测定膳食补充剂中褪黑素的含量测定程序的分析特征。具体考察了分析特异性、线性、灵敏度、准确度和精密度(重复性)。

分析特异性(或峰鉴定结果)通过保留时间和UV/Vis谱图确认。在相同的LC条件下,在Empower CDS中根据标准品创建UV/Vis谱库,并用于确认样品分析中的峰ID(使用PDA谱库匹配)。此外,通过峰纯度(峰两侧的拐点处)检查是否存在潜在干扰(共洗脱)的迹象。本研究分析的样品中褪黑素含量测定未发现干扰。

图1为UV响应(峰面积)与褪黑素浓度的关系图。数据集包括0.001~0.1 mg/mL范围内五个浓度水平的重复进样结果。通过最小二乘回归(未加权)得到过零点拟合线,决定系数(R^2)大于0.999。所有数据点相对于校准曲线的相对误差均在±5%以内(数据未显示)。这种优异的线性验证了单点校准方法,即USP褪黑素各论推荐的含量测定方法。

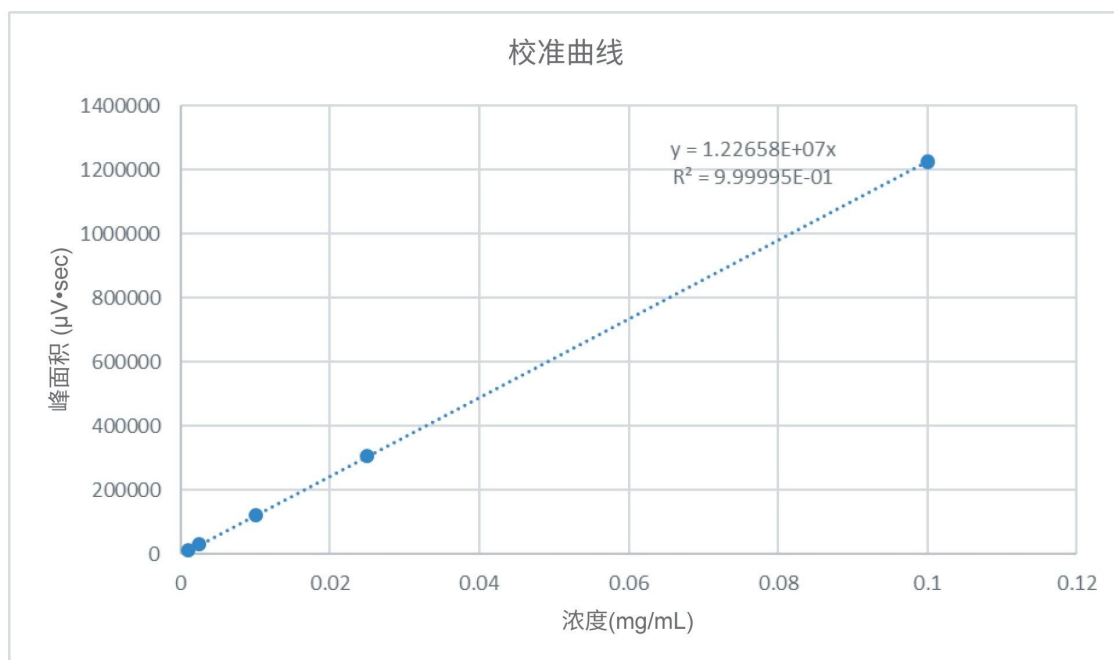


图1.在0.001至0.1 mg/mL的范围内的5个浓度水平下重复进样得到的褪黑素校准曲线（UV峰面积与浓度）。（斜率： 1.227×10^7 ； R^2 ：0.999995）。

按照US FDA Q2(R1) Validation of Analytical Procedure（分析程序验证），使用低浓度褪黑素溶液(0.25 μg/mL)估算定量限(LOQ)⁵。使用褪黑素峰标准偏差乘以10除以校准曲线斜率的方法得到LOQ为0.5 μg/mL。在调整进样体积后，该LOQ与其他基于LC-UV的研究报告的LOQ值大致相同⁶⁻⁸。

我们使用膳食补充剂样品通过加标实验评估该分析方法的准确度。取三种含有不同浓度（1~10 mg/份）褪黑素的液体、软胶囊和片剂补充剂，按照与其天然褪黑素水平不同的浓度进行加标（见表2）。通过比较实测加标量与理论加标量计算回收率结果。平均回收率为98.2%~106.6%，重复性（相对标准偏差，RSD）小于5.8% (n=3)。褪黑素QC溶液（0.1 mg/mL褪黑素）的结果也表现出优异的准确度和重复性（平均准确度为100.5%，RSD为0.8%，n=3）。

样品	天然浓度 (mg/份)	加标浓度 (相对于天然浓度)	平均回收率 (n=3)	RSD
A	1.26	77%–94%	106.6%	5.1%
B	10.76	76%–79%	102.3%	1.0%
E	6.40	47%–66%	98.2%	5.8%
褪黑素QC	0.1 mg/mL	N/A	100.5%	0.8%

表2. 准确度和重复性结果汇总。

样品分析

图2显示了六种补充剂的HPLC-UV色谱图。表3详细列出了这六种补充剂的样品分析结果。褪黑素含量测定结果比标示量高3%~42%。重复性(RSD)值小于4.0%。在膳食补充剂生产过程中，许多成分的添加量都高于标示量。与膳食补充剂中的其他成分相比，褪黑素含量超标的情况并不少见⁹。根据之前的研究报告，膳食补充剂中褪黑素的含量非常高（是标示量的四到五倍）。在本研究中，我们未发现任何褪黑素含量如此之高的产品^{7,8}。

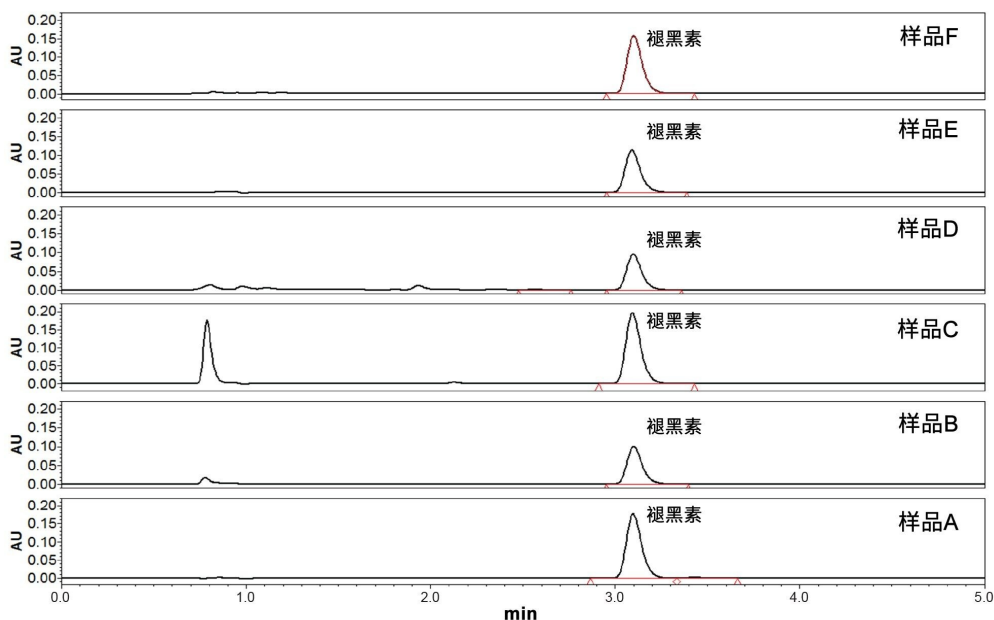


图2. 在含量测定条件下（请参阅“实验”部分）获得的6种膳食补充剂的HPLC-UV色谱图。

样品代码	标示量 (mg/份)	实测值 (mg/份)	RSD (n≥3)	与标示量差异 (%)
A	1	1.26	0.4%	26%
B	10	10.76	0.7%	8%
C	5	6.29	2.5%	26%
D	2	2.83	1.7%	42%
E	5	6.40	4.0%	28%
F	3	3.08	1.5%	3%

表3. 样品分析结果以及与标示量的对比。

这些样品中还含有各种其他成分，例如天然香料和天然色素（见表1）。这些成分会干扰USP褪黑素杂质检测，因此未对这些样品进行杂质检测。

结论

为解决近期公众对膳食补充剂中褪黑素含量的担忧，我们使用Arc HPLC系统和XBridge BEH C₁₈色谱柱(130 Å, 2.5 μm, 4.6 mm x 75 mm)对USP褪黑素分析方法进行了现代化。优化后的USP褪黑素含量测定方法在特异性、线性、灵敏度、准确度和精密度方面表现出优异的分析性能。我们成功分析了六种含有褪黑素的补充剂产品，每份含1 mg至10 mg，分别为液体、片剂、软胶囊和胶囊剂型。结果表明，这些产品中褪黑素过量的比例在3%~42%之间。这种现代化的USP褪黑素含量测定方法适用于对补充剂中的褪黑素进行快速、经济的分析。

参考资料

1. Stobbe, M. Melatonin poisoning reports are up in kids, study says. Associated Press. June 2, 2022. <https://apnews.com/article/covid-science-health-poisoning-716dbfe4eb49fc4cc224d388d91e8dbf> <
<https://apnews.com/article/covid-science-health-poisoning-716dbfe4eb49fc4cc224d388d91e8dbf>>
.Accessed on May 12, 2023.
2. LaMotte, S. Potentially dangerous dose of melatonin and CBD found in gummies sold for

sleep.CNN.April 25, 2023.<https://edition.cnn.com/2023/04/25/health/melatonin-gummies-wellness/index.html> <<https://edition.cnn.com/2023/04/25/health/melatonin-gummies-wellness/index.html>> .Accessed on May 12, 2023.

3. Melatonin Monograph.United States Pharmacopeia, Docid: GUID-454646BE-F1DF-458C-9011-1FBBCCEFE5BC_4_en-US, 2023.
4. Yang, J.; Rainville, P. 通过对USP褪黑素各论中的含量测定和杂质分析方法进行现代化以提高通量并减少溶剂浪费, 沃特世应用纪要 [720007978ZH](#), 2023.
5. US FDA.Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guidance for Industry.Sept. 2021. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q2r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology-guidance-industry> <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q2r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology-guidance-industry>> .Accessed on June 2nd, 2023.
6. Cerezo, A.B.; Leal, A.; Álvarez-Fernández, M.A.; Hornedo-Ortega, R.; Troncoso, A.M.; García-Parrilla, M.C.; Quality control and determination of melatonin in food supplements, *J. Food Compos.Anal.*, 2016; 45: 80-86.doi: 10.1016/j.jfca.2015.09.013.
7. 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.
8. 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.
9. Andrews, K.W.; Gusev, P.A.; McNeal, M.; Savarala, S.; Dang, P.T.V.; Oh, L.; Atkinson, R.; Pehrsson, P.R.; Dwyer, J.T.; Saldanha, L.G.; Betz, J.M.; Costello, R.B.; Douglass, L.W. Dietary Supplement Ingredient Database (DSID) and the Application of Analytically Based Estimates of Ingredient Amount to Intake Calculations, *J Nutr.*, 2018; 148(2): 1413S-1421S, doi: 10.1093/jn/nxy092.

特色产品

[Arc HPLC系统](#) </nextgen/cn/zh/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>](https://www.waters.com/1001362)

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

720008009ZH, 2023年7月



© 2024 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](#)