

功能因子 Melatonin(褪黑素)的 HPLC 分析检测方法研究

顾 鹏 罗 祎 李 东

(北京市营养源研究所 北京 100054)

摘 要 Melatonin(褪黑素)以其独特的昼夜排泌节律日益引起人们的重视,本文根据 melatonin 的特点建立了高效快捷的 HPLC 分析检测方法,此方法具有样品处理简单、快速、定量准确和重复性好等特点。其 CV% 值分别为 1.46% 和 2.03%。

关键词 褪黑素 松果腺 HPLC

1 概述

褪黑激素(Melatonin, MLT)是 1958 年 Lerner 等首先从牛的松果体提取物中分离出来的,能使蛙皮褪色的一种激素¹。化学名称是 N-乙酰-5-甲氧基巴胺,分子式: $C_{13}H_{16}N_2O_4$, 分子量: 232.28。后来进一步证实褪黑素是主要由松果腺细胞合成和分泌的吲哚类激素,是人体内分泌系统的调节剂。它不仅与人体发育、脑功能、生殖功能相关,且参与催眠、镇痛和免疫效应等活动,对于延续人体衰老和抵抗老年性疾病具有一定作用,甚至某些肿瘤和神经等系统疾病的发生和发展也与褪黑素的独特昼夜排泌节律有联系。

2 国内外研究现状

自 1958 年首次从松果腺中分离出褪黑素到目前为止,约 40 多年时间,对 MLT 的研究相对集中在功能性上,MLT 结合位点是否同动物实验一样存在于正常人组织和肿瘤组织中,其生理功能如何,至目前为止尚待进一步研究,但越来越多的实验证明这些结合位点与 MLT 受体在生理学上具相关性。进入九十年代,我国沈阳药学院,以及安徽医科大学临床药理研究所、第四军医大学等对松果腺及褪黑素进行了较系统的研究。通过大量的研究使最初被认为是退化器官的松果腺及其分泌物褪黑素逐渐受到人们的重视。

作为一种综合性激素,研究较多的是 MLT 对内分泌系统的作用。MLT 已被发现对神经内分泌系统和非内分泌系统有一定的生理调节作用,也发现与某些疾病乃至肿瘤有某种相关,但在确定 MLT 与各种疾病之间的因果关系上有许多困难。在褪黑素的含量分析方面,国际一直使用 RIA 法,

Sieghart 1987 年改进 RIA 法,采用反向 C_{18} 柱提取血清中 MLT,其重现性较好,能迅速、精确检测 MLT 含量。本文采用高效液相色谱仪检测褪黑素的含量也有很多种色谱条件如:

2.1 检测器: 紫外检测器 波长: 222nm 色谱柱: SOD2 250 × ϕ 4.6mm 柱温: 38℃
流动相: 0.05M 磷酸氢二钠: 甲醇 = 55:45
流速: 1.0mL/min 进样体积: 20 μ L

2.2 检测器: 荧光检测器 ($\lambda_{ex} = 295nm$; $\lambda_{em} = 345nm$)
色谱柱: 250 × ϕ 4.6mm 内径内装 5 μ m C_{18} 键合硅胶反向柱和 20 × ϕ 4.6mm LC-18(5 μ m) 预柱 流动相: 水: 甲醇 = 75:25(v/v) 流速: 1.0mL/min

2.3 电流检测器 配有碳电极和不锈钢柱 250 × ϕ 4.6mm 内径,内装 10 μ m IRICA RP-18; 流动相: 0.1M 醋酸钠, 0.1M 柠檬酸(pH 4.1), 0.03mM Na_2EDTA , 与 5% ~ 30% 乙腈或 10% ~ 37% 甲醇 流速: 0.5mL/min

3 实验部分

3.1 实验设备、标准、试剂

SHIMADAZU 10AVP 高效液相色谱仪,配有 LC-10ATVP 泵两台、SIL-10ADVP 自动进样器、RF-10AXL 荧光检测器、SPD-M10AVP 二极管阵列检测器、CTO-10AVP 柱温箱、SCL-10AVP 系统控制器、DGU-12A 脱气装置、RID-10A 示差折光检测器、装有岛津公司 CLASS vp-5.2 色谱工作站的终端处理器。

标准品(sigma 公司)、磷酸氢二钠(分析纯)、甲醇(色谱纯)、三次超纯水

样品: 由 GENIYME Corporation, Cambridge MA

USA 生产的 MELATONIN Pharmaceuticals

3.2 色谱条件

检测器: 二极管阵列检测器 检测波长: 222nm

色谱柱: SOD2 250 × φ4.6mm

流动相: 0.35M 磷酸氢二钠: 甲醇 = 35:65 (配制并用 0.45μm 滤膜过滤)

柱温: 38℃

流速: 1.0mL/min

4.1 外标法定量测定

表 1 对样品中的 melatonin 检测结果表

项目	样品浓度 μg/mL	样品峰 面积	标准单位 面积所对 应的浓度	计算 结果	测定 结果
	104.0	59024		0.55%	
样品	454.6	242084	9.73×10^{-6}	0.52%	0.54%
	909.2	511762		0.55%	

melatonin 检测高压液相色谱图如图 1。

4 结果与讨论

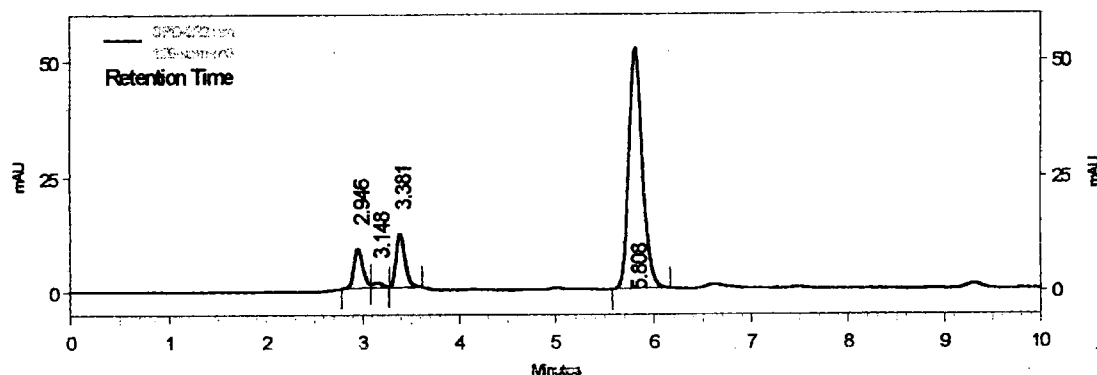


图 1 melatonin 检测高压液相色谱图

4.2 分析方法的评价

实验中对两种实验样品采用同一方法分别平行测定 8 次并计算其相对标准偏差 (RSD%) 分别为 1.87% 和 2.19%; CV% 分别为 1.46% 和 2.03%。

表 2 melatonin 检测回收率计算表

实验序号	测得峰面积	样品峰面积	峰面积差值	均值	回收率
1	276610	59024	217586		
2	467741	242084	225657		
3	741185	511762	229423	225599	102%
4	1397269	1167540	229729		

注: 标准含量按 100% 计。

本方法具有操作简便、迅捷、准确度高、精密度高特点。

参考文献

1. Brown RP et al: Aacta Psychiatr Scand 1987;76(3):272
2. Bartsch C et al: Neuroendocrino Lett 1987;9(5):284
3. 梅琦等, 生理科学进展 1995;26(2):152 ~ 154
4. Maestroni GJM Conti A, Pierpavli W. J Neuroimmunol, 1996; 13:19 ~ 30
5. 徐峰等, 中国药理学通报 1994 Dec;10(6)448 ~ 452
6. Aldo Lagana, Aldo Marino, Analytica Chimica Acta 316 (1995)377 ~ 385

Determination of melatonin by high performance liquid chromatography

Gu peng luo yi Li dong

(Beijing research institute for nutritional resources 100054)

Abstract Melatonin which is produced by extrapineal tissues, is believed to influence reproductive, cerebriic and growth functions in a wide variety of species. A method for determination of melatonin by HPLC is introduced. The value of CV% is 1.46% and 2.03% respectively. The method is simple, rapid, sensitive and veracious.

Key words melatonin pineal gland HPLC