

UHPLC – MS/MS 法测定人血浆中褪黑素浓度

Determination of melatonin concentration in human plasma by UHPLC – MS/MS

黄 冉^{1,2}, 刘海艳³, 曾 阳³,
段思美², 李 专¹

(1. 湖南师范大学 医学院, 湖南 长沙 410081;
2. 长沙晶易医药科技股份有限公司, 湖南 长沙
410221; 3. 湖南科锐斯医药科技有限公司, 湖南
长沙 410221)

HUANG Ran ^{1,2}, LIU Hai – yan ³,
ZENG Yang ³, DUAN Si – mei ²,
LI Zhuan ¹

(1. College of Medicine, Hunan Normal
University, Changsha 410081, Hunan
Province, China; 2. Changsha Jing Yi
Pharmaceutical Technology Co., Ltd.,
Changsha 410221, Hunan Province,
China; 3. Hunan Creates Med Technology
Co., Ltd., Changsha 410221, Hunan
Province, China)

作者简介: 黄冉(1997 –), 女, 硕士研究生, 主
要从事药物分析研究
通信作者: 李专, 教授, 博士生导师
Tel: (0731) 88912403
E – mail: zhuanli@hunnu.edu.cn

摘要:目的 建立高效灵敏准确的超高效液相质谱联用法(UHPLC – MS/MS)测定人血浆中褪黑素(MLT)浓度。方法 用UHPLC – MS/MS法测定人血浆中褪黑素浓度。血浆样品用乙腈进行蛋白沉淀前处理, 以其同位素褪黑素 – d4 (MLT – d4)做内标。用ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 50.0 mm, 1.7 μm) 反向色谱柱, 以0.05 mM 氟化铵 – 乙腈为流动相进行梯度洗脱, 流速为0.4 mL · min⁻¹, 采集时间为3 min。用电喷雾离子源(ESI +), 正离子模式, 多反应监测(MRM)扫描方式进行监测。待测化合物褪黑素, 离子反应为 m/z 233.0 → 174.0, 内标(褪黑素 – d4)离子对为 m/z 237.2 → 178.2。该方法应用于一项单中心、随机、开放、单次口服给药药代动力学试验, 空腹及餐后各入组12例受试者, 给药剂量为2 g(含有4 mg 褪黑素), 用WinNonlin 8.3或以上版本或SAS 9.4或以上版本对药代动力学参数 C_{max} (ΔC_{max})、 AUC_{0-1} (ΔAUC_{0-1}) 和 $AUC_{0-\infty}$ ($\Delta AUC_{0-\infty}$) 分别进行统计分析。结果 人血浆中褪黑素定量下限为50.00 pg · mL⁻¹; 在50.00 ~ 50 000.00 pg · mL⁻¹ 呈现较好的线性 $y = 2.00x + 1.12 \times 10^{-4}$ ($r^2 > 0.9994$); 批内和批间精密度的结果显示, 不同浓度相对标准偏差(RSD)均不超过5.77%, 准确度在92.11% ~ 102.01%之间。低、中、高浓度质控样品提取回收率分别为103.35%、113.75%和131.21%, 变异系数为12.13%, 无基质效应。通过12例健康人体药代动力学研究首次发现, 服用相同剂量的褪黑素后, 餐后的 C_{max} 约为空腹的50%, 但AUC基本一致, 说明食物可能影响褪黑素在体内的吸收及代谢。结论 该方法专属性强、精密度高、灵敏度高, 能快速准确测定人血浆中褪黑素含量, 并用于褪黑素的人体药代动力学研究。

关键词:褪黑素; 失眠; 超高效液相质谱联用; 药代动力学

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.18.015

中图分类号:R917 **文献标志码:**A

文章编号:1001-6821(2025)18-2655-06

Abstract: Objective To establish a highly efficient, sensitive, and accurate ultra – high performance liquid chromatography – mass spectrometry (UHPLC – MS/MS) method to determine the concentration of melatonin (MLT) in human plasma with heparin sodium. **Methods** The concentration of melatonin in plasma was measured using UHPLC – MS/MS. Plasma sample preparation was done by protein precipitation using acetonitrile, its isotope melatonin – d4 (MLT – d4) was used as the internal standard (IS). Using UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 50.0 mm, 1.7 μm) reverse phase chromatography column, gradient elution was performed with a mobile phase consisting of acetonitrile – water (0.05 mM Ammonium fluoride) at a flow rate of 0.4 mL · min⁻¹ for 3 min. MLT was monitored using positive electrospray triple quadrupole mass spectrometer via multiple reaction monitoring (MRM) mode. The

monitored transitions were set at m/z 233.0 $\rightarrow$ 174.0 for MLT. Moreover, the IS was set at m/z 237.2 $\rightarrow$ 178.2. This method was applied in a single-center, randomized, open-label, single oral dose pharmacokinetic trial, with 12 subjects in each group for fasting and after meals, administered a dose of 2 g (containing 4 mg of melatonin). Statistical analysis of pharmacokinetic parameters $C_{\max}$ ($\Delta C_{\max}$), AUC_{0-1} (ΔAUC_{0-1}), and $AUC_{0-\infty}$ ($\Delta AUC_{0-\infty}$) using WinNonlin version 8.3 or above or SAS version 9.4 or above. **Results** The achieved lower limit of quantification was 50.00 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The validated method had an excellent linearity in the range of 50.00–50 000.00 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ for MLT $y = 2.00x + 1.12 \times 10^{-4}$ ($r^2 > 0.9994$). The results of the intra-batch and inter-batch precision showed that the relative standard deviation (RSD) at different concentrations did not exceed 5.77%, and the accuracy was between 92.11%–102.01%. The extraction recoveries of low, medium and high quality control samples of MLT were 103.35%, 113.75% and 131.21%, respectively. The coefficient of variation was 12.13%. No significant matrix effect was found. Through the pharmacokinetic study of 12 healthy humans, it was found for the first time that after taking the same dose of melatonin, the postprandial $C_{\max}$ was about 50% of that of fasting, but the AUC was very similar, indicating that food might affect the absorption and metabolism of melatonin in the body. **Conclusion** This method has strong specificity, good precision and high sensitivity, which can quickly and accurately determine the content of melatonin in human plasma with heparin sodium, and is used for the detection of human blood drug concentration and pharmacokinetics of melatonin.

Key words: melatonin; insomnia; ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry; pharmacokinetics

失眠症是睡眠障碍性疾病中最常见的一种疾病,长期失眠往往伴随着精神疾病的发生,严重影响人群的健康状态以及生活质量^[1]。褪黑素(melatonin, MLT)作为一种内源性激素,分泌不足将导致睡眠障碍。外服褪黑素可提高体内的褪黑素浓度水平,临床上广泛应用于失眠症的治疗^[2]。目前,测定生物样本中褪黑素的方法主要为液相色谱质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS/MS)法^[3-5]或气相色谱质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS/MS)法^[6],这些方法的前处理操作使用比较复杂液液萃取法^[4]或者采集时间较长^[3,6]或定量下限较高^[6]。本试验建立了快速、高效的超高效液相质谱联用(ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry, UHPLC-MS/MS)法测定人血浆中褪黑素浓度。可用于人体内源性褪黑素的浓度监测,并应用于临床血药浓度检测及药代动力学研究。

材料、对象与方法

1 材料

药品和试剂 儿童褪黑素颗粒,规格:每袋1 g/2 mg,批号:AFG06,日本ノーベルファーマ株式会社生产;褪黑素,规格:每瓶50 mg,含量为95.47%,校正因子0.9547,批号:24-07-1803,购自深圳菲斯生物科技有限公司(SINCO PHARMACHEM);褪黑素-

d4(内标),规格:每瓶2.5 mg,含量为100.00%,同位素纯度为98.60%,批号:1127-RE-0102,购自广州佳途科技股份有限公司(CATO Research Chemicals Inc)。

仪器 LC-30AD 高效液相色谱仪,日本岛津仪器有限公司产品;Triple QuadTM 6500+ 质谱系统,美国SCIEX公司产品;ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm $\times$ 50.0 mm, 1.7 μm) 色谱柱,美国沃特世(Waters)公司产品。

2 受试者选择

本研究经桂林医学院附属医院药物临床试验伦理委员会审批通过(伦理批号:YBE2024006)。空腹与餐后试验各入组12例健康的合格受试者,其中空腹试验入组男性7例,女性5例。年龄(30.58 ± 6.16)岁,身高(160.33 ± 9.43)cm,体重(58.75 ± 8.18)kg,体质指数(body mass index, BMI)为(22.84 ± 2.45) $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$ 。餐后试验入组男性10例,女性2例。年龄(30.83 ± 6.44)岁,身高(168.92 ± 6.92)cm,体重(63.91 ± 10.07)kg, BMI为(22.83 ± 2.23) $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$ 。所有受试者都签署知情同意书。

入选标准 ①年龄在18~60周岁(包含边界值)的中国健康参与者,不限性别;②男性体重 ≥ 50 kg,女性体重 ≥ 45 kg, BMI在18.5~28.0 $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$ 之间,包含边界值;③研究前对研究内容、过程及可能出现的不良反应了解充分,并签署知情同意书;④能理解和遵守本项研究的各项要求。

排除标准 ①对本品或任何一种辅料过敏者,或

过敏体质者、或有特定过敏史者;②有心血管系统、内分泌系统、神经系统、血液和淋巴系统、免疫系统、肾脏、肝脏、胃肠道、呼吸系统、代谢(如高钾血症)及骨骼等病史,且经研究者判断为异常有临床意义者;③经口摄取不良者或正接受非口服营养疗法者;④使用过与褪黑素有药物相互作用的药物或抑制/诱导肝脏对药物代谢的药物、咖啡因者;⑤吸烟或酗酒者或每天饮用过量茶、咖啡或含咖啡因的饮料者;⑥筛选时体检或实验室检查异常且有临床意义者。

3 分组、给药与样本采集

研究设计为单中心、随机、开放、单次口服给药研究。空腹实验参与者于给药前2天入住观察室,统一饮食及生活管理。在服药前24 h及采集~24 h血样后,统一进食标准早餐。给药前禁食10 h以上,给药当天早上在空腹状态下,用240 mL水送服试验制剂2 g(含有4 mg褪黑素)。餐后试验参与者于给药前2天入住观察室,统一饮食及生活管理。在服药前24 h、0 h及30 min时开始统一进食高脂高热量早餐,并且在30 min内进食完,进食高脂餐前禁食10 h以上,在研究当日清晨给药前30 min时统一进食高脂高热量早餐,并且在30 min内进食完毕,在开始进食后30 min(± 1 min)时,准时用240 mL水送服试验制剂2 g(含有4 mg褪黑素)。分别于服药前24.00、12.00、0.00 h及服药后0.08、0.17、0.25、0.33、0.42、0.50、0.67、0.83、1.00、1.33、1.67、2.00、2.50、3.00、3.50、4.00、5.00、6.00、8.00、10.00 h,共计23个采血点,采集静脉血约4 mL置于肝素钠抗凝采血管中。采血管需提前冰浴,采集的血样混匀后即刻置于冰水浴中,并于1 h内离心,分离血浆,保存于 -80°C 冰箱中保存至测定。

4 测定方法

色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C_{18} (2.1 mm $\times$ 50.0 mm, 1.7 μm);流动相为0.05 mM 氟化铵(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0.00~1.00 min, 75%~45% A;1.00~1.20 min, 45%~5% A;1.20~2.00 min, 5% A;2.00~2.01 min, 5%~75% A;2.01~3.00 min, 75% A;流速0.4 mL $\cdot$ min $^{-1}$ 。柱温设定为 40°C ;进样量设定为10 μL ,采集时间为3 min。

质谱条件 采用离子喷雾离子化源(electrospray-ionization, ESI),正离子模式;离子喷射电压为4 000 V;温度: 500°C ;雾化气为379 kPa;去簇电压为414 kPa;气帘气体为241 kPa;扫描方式为多反应监测;褪黑素,褪黑素-d4去簇电压分别为50、50 V;碰撞能量分别为17、23 eV;待测化合物褪黑素,离子反应为

m/z 233.0 $\rightarrow$ 174.0,内标(褪黑素-d4)离子对为 m/z 237.2 $\rightarrow$ 178.2。

标准曲线工作液配制 取褪黑素对照品适量,经校正因子折算后,精密量取一定体积甲醇溶解并摇匀,制成1.00 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的对照品储备液。以50%甲醇为稀释剂,定量稀释配制成1.00、2.00、8.00、32.00、120.00、480.00、800.00、1 000.00 ng $\cdot$ mL $^{-1}$ 的系列标准曲线工作液。

质控工作液配制 取褪黑素对照品适量,经校正因子折算后,精密量取一定体积甲醇溶解并摇匀,制成1.00 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的对照品储备液。以50%甲醇为稀释剂,定量稀释配制成1.00、1.50、30.00、300.00、750.00、3 000.00 ng $\cdot$ mL $^{-1}$ 的质控工作液。

内标工作液配制 计算褪黑素-d4对照品经校正因子折算后的质量,精密量取一定体积甲醇溶解并摇匀,制成1.00 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的储备液,以50%甲醇为稀释剂,定量稀释配制成10.00 ng $\cdot$ mL $^{-1}$ 的内标工作液。

基质标准曲线溶液配制 分别取10 μL 对应浓度的标准曲线工作液,用190 μL 空白基质定量稀释成50.00、100.00、400.00、1 600.00、6 000.00、20 000.00、40 000.00、50 000.00 pg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的基质标准曲线溶液。

质控样品配制 分别取对应的质控工作液20 μL ,用空白基质380 μL 定量稀释成50.00、75.00、1 500.00、15 000.00、37 500.00、150 000.00 pg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的质控样品溶液。

血浆样品配制 样品使用前涡旋混匀至少3 min,吸取血浆样本50 μL ,加入置96孔板中相应位置。各样品中加入内标工作溶液50 μL ,震荡混匀3 min。各样品中加入乙腈200 μL 进行蛋白沉淀,震荡混匀5 min,于 5°C 条件下以5 950 r $\cdot$ min $^{-1}$ 离心10 min。取上清液100 μL 置另一96孔板中,各样品中加入100 μL 超纯水,封膜,涡旋混匀至少3 min,取10 μL 进样,进行UHPLC-MS/MS分析。

5 方法学考察

专属性 对6种不同来源的空白血浆、1种空白高脂基质、1种空白溶血基质配制的双空白样品和定量下限质控样品进行分析。将空白血浆与定量下限(lower limit of quantification, LLOQ)样品中的待测物和内标峰面积进行对比,考察目标化合物在空白血浆中是否存在干扰,干扰峰面积应小于待测物LLOQ面积的20%,小于内标峰面积5%。另外,考虑到待测物与内标物可能存在相互干扰,通过分析6个只含待

测物的定量上限(upper limit of quantification, ULOQ - only)样品,考察待测物对内标的干扰。ULOQ - only样品在内标保留时间处,干扰峰面积平均值应不超过仅含内标物样品(samples spiked with internal standard only, IS - only)中内标峰面积平均值的5%。通过分析6个重复IS - only样品考察内标对待测物的干扰。IS - only样品中待测物干扰峰面积平均值应不超过仅含待测物LLOQ样品平均峰面积的20%。

标准曲线与定量下限 分别取10 μL 对应的标准曲线工作液,用空白血浆190 μL 稀释,混匀,配制成褪黑素质量浓度为50.00、100.00、400.00、1 600.00、6 000.00、24 000.00、40 000.00、50 000.00 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准曲线血浆样品,低浓度质控样品(low quality control sample, LQC)、中浓度质控样品(middle quality control sample, MQC)1、MQC2、高浓度质控样品(high quality control sample, HQC)浓度分别为50.00、1 500.00、15 000.00、150 000.00 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,按“血浆样品配制”操作,记录色谱图,以浓度(x)为横坐标,以褪黑素与内标的峰面积比值(y)为纵坐标进行权重回归(权重系数为 $1/x^2$)。校正标样回算的浓度应均在标示值的 $\pm 15\%$,LLOQ应在标示值的 $\pm 20\%$ 。

精密度与准确度 取褪黑素的LLOQ、LOQ、MQC1、MQC2和HQC 5个质量浓度的质控样品,按“血浆样品配制”方法操作,每个浓度6个样本,测定3个分析批次,根据相应分析批次的随行标准曲线计算质控样品中待测物的浓度,计算批内与批间精密度(relative standard deviation, RSD)和准确度(relative error, RE)。批内和批间的RE%及RSD%均应 $< \pm 15\%$ (LLOQ应 $\leq 20\%$)。

回收率 将LQC、MQC、HQC质控样品各6份和至少18份不含内标与待测物的双空白样品一同提取,在提取后的空白样品中加入待测物与内标使其浓度与LQC、MQC、HQC样品相同。将经过前处理样品与未经过前处理样品的待测物和内标物峰面积进行比较计算回收率。

基质效应 本实验同时用2种考察方式进行基质效应考察。考察方式一为采用6份不同来源的空白血浆分别配制LQC、HQC质控样品各18份(每个浓度水平、每个空白基质配制3个),实测浓度与理论浓度值的平均偏差应不超过 $\pm 15\%$,变异系数(coefficient of variation, CV)应不超过15%。考察方式二为采用6份不同来源的经前处理提取后的空白基质分别配制LQC、HQC质控样品各6份(每个浓度水平、每个空白基质配制1个),并配制LQC、HQC纯溶液样品各

6份。对比基质样品与纯溶液之间的内标归一化基质效应因子评价基质效应。6份不同来源基质计算的内标归一化的基质因子变异系数应不超过15%。

溶血效应与高脂血效应 在空白血浆中加入2%溶血全血(加入红细胞破裂的全血至2%体积比),并加入待测物配制成低、高浓度质控样品,每个浓度平行配制6份。将溶血血浆配制的质控样品与常规血浆配制的标准曲线和质控样品比较来考察。高脂血浆[空白血浆中加入中/长链脂肪乳注射液(C6~24)配成含1%脂肪乳的高脂血浆]的基质效应通过至少1个批次的高脂血浆分别在低、高质控样品浓度来评估,每个浓度平行配制6份。将高脂血浆配制的质控样品与常规血浆新配制的标准曲线和质控样品比较来考察。低、高浓度样品的平均准确度偏差应在 $\pm 15\%$ 内,同一浓度变异系数应不超过15%。

稳定性 考察低、高浓度(75.00、37 500.00 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)质控样品在室温白光(10~30 $^{\circ}\text{C}$)放置28 h,样品处理后5 $^{\circ}\text{C}$ 放置122 h, -20 $^{\circ}\text{C}$ 和80 $^{\circ}\text{C}$ 循环冻融5次, -20 $^{\circ}\text{C}$ 长期及-80 $^{\circ}\text{C}$ 长期冷冻保存41 d条件下稳定性。

6 统计学处理

用WinNonlin 8.3对药代动力学参数 $C_{\max}$ ($\Delta C_{\max}$)、 AUC_{0-t} (ΔAUC_{0-t})和 $\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\Delta \text{AUC}_{0-\infty}$)分别进行统计分析。

结 果

1 方法学评价

专属性 褪黑素和内标褪黑素-d4的保留时间分别为0.94和0.93 min,空白血浆中的内源性物质对待测物和内标的测定无干扰,内标与待测物互不干扰,结果见图1。

标准曲线与定量下限 褪黑素标准曲线的回归方程 $y = 2.00x + 1.12 \times 10^{-4}$ ($r^2 = 0.9994$) 在50.00~50 000.00 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性良好。定量下限为50.00 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,平行连续测定6次,准确度为102.01%,RSD为1.07%。

精密度与准确度 褪黑素的5个质控样本(LLOQ, LQC、MQC1、MQC2、HQC)批内和批间RSD均小于 $< 5.77\%$,准确度在92.11%~102.01%之间。结果见表1。

回收率 褪黑素的低、中、高三个质量浓度质控样品提取回收率分别为103.35%、113.75%、131.21%,3个质量浓度质控样品变异系数为12.13%;18个提取后质控样品内标平均提取回收率

为112.95%,变异系数为4.86%;均符合要求,表明提取回收率稳定均一。

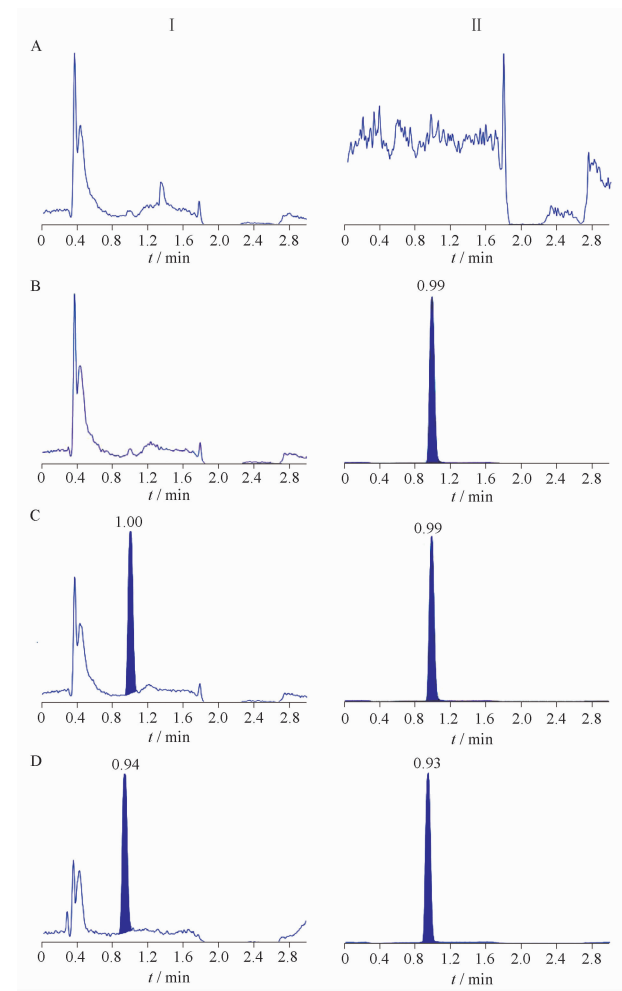


图1 人血浆中褪黑素及褪黑素-d4(内标)典型图谱
Figure 1 Typical chromatograms of melatonin and melatonin - d4(internal standard)in heparin sodium human plasma
A:Double blank;B:Only internal standard blanks;C:Lower limit of quantification(50 pg · mL⁻¹) for melatonin in plasma and internal standard;
D:Plasma sample collected from a healthy volunteer after oral administration of melatonin (spiked with internal standard); I : Melatonin;
II :Melatonin - d4.

表1 褪黑素在人血浆中的精密度和准确度

Table 1 The precision and accuracy of melatonin in human plasma

Concentration (pg · mL ⁻¹)	Intra - day(n = 6)		Intra - day(n = 18)		Accuracy(%)	
	Measured	RSD	Measured	RSD	Measured	RSD
	(pg · mL ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$)	(%)	(pg · mL ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$)	(%)	(% , $\bar{x} \pm s$)	(%)
50	51.00 ± 0.54	1.06	48.07 ± 2.54	5.28	102.01 ± 1.09	1.07
75	71.79 ± 0.88	1.23	72.17 ± 1.92	2.66	95.72 ± 1.17	1.22
1 500	1 463.67 ± 21.02	1.44	1 482.44 ± 24.45	1.65	97.58 ± 1.40	1.43
15 000	14 430.00 ± 143.81	1.00	14 872.22 ± 607.86	4.09	96.20 ± 0.96	1.00
37 500	34 541.67 ± 384.63	1.11	36 340.56 ± 2 095.69	5.77	92.11 ± 1.03	1.12

RSD;Relative standard deviation.

基质效应 考察方式一:低、高浓度实测浓度与理论浓度平均偏差在 - 10.40% ~ - 3.60%、-10.61% ~ -5.17% 之间,变异系数在 0.79% ~3.66%、1.21% ~ 2.29% 之间。考察方式二:低、高浓度内标归一化基质因子变异系数分别为 1.03%、2.88%。表明基质效应无影响。

溶血效应与高脂血效应 溶血基质样品低、高浓度平均准确度偏差分别为 - 8.01%、- 9.02%,变异系数分别为 1.55%、1.05%;高脂基质样品低、高浓度平均准确度偏差分别为 - 7.03%、- 4.39%,变异系数分别为 3.21%、1.46%。均符合要求。

稳定性 在上述条件下,褪黑素质控质量浓度为 75.00、37 500.00 pg · mL⁻¹,样品的准确度偏差在 - 8.11% ~ 13.45% 之间,RSD 均不超过 5.32%。表明褪黑素混合样品在上述条件下稳定性较好。

2 药代动力学结果

受试者入组情况 空腹试验共筛选受试者30例,共入组 12 例健康受试者(男 7 例,女 5 例)。所有受试者均按要求服用药物且在试验期间无参与者退出或样本脱落的情况。餐后试验共筛选例受试者30例,共入组 12 例健康受试者(男 10 例,女 2 例)。所有受试者均按要求服用药物且在试验期间无参与者退出或样本脱落的情况。空腹及餐后所有受试者均纳入全分析集、安全性分析集、药代动力学浓度集。

药代动力学 对于药代动力学数据集,所有参与者各个时间点的血浆中褪黑素的血药浓度测定数据,均根据基线校正前血药浓度和基线校正后血药浓度分别计算各参与者的药代动力学参数。口服儿童褪黑素颗粒(2 g 含 4 mg 褪黑素)空腹及餐后平均药时曲线见图 2,相关药代动力学参数见表 2。

12 例健康受试者空腹和餐后口服儿童褪黑素颗粒(2 g 含 4 mg 褪黑素)扣除本底后体内血浆中褪黑素的消除半衰期($t_{1/2}$)分别为(0.78 ± 0.16)和(1.06 ± 0.34)h;AUC_{0-last} 分别为(22 092.46 ± 7 370.20)

和(21 293.29 ± 9 497.20) h · pg · mL⁻¹, $C_{\max}$ 分别为(29 759.26 ± 13 539.30) 和(10 964.62 ± 5 355.90) pg · mL⁻¹。通过12例健康人体药代动力学研究首次发现,服用相同剂量的褪黑素后,餐后的 $C_{\max}$ 约为空腹的50%,但AUC基本一致,说明食物可能影响褪黑素在体内的吸收及代谢。

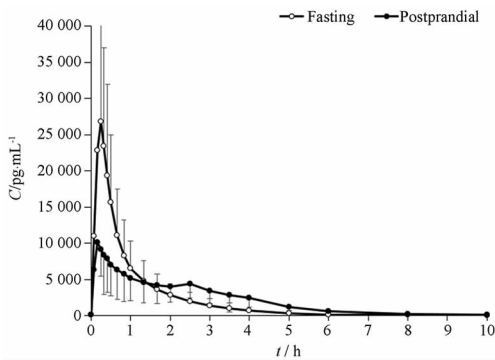


图2 空腹及餐后条件下健康受试者口服儿童褪黑素颗粒(2 g,含褪黑素4 mg)平均血药浓度-时间曲线

Figure 2 Average blood concentration - time curve of oral children's melatonin granules(2 g,containing 4 mg of melatonin) in healthy subjects under fasting and postprandial conditions

表2 12例健康受试者口服儿童褪黑素颗粒(2 g,含褪黑素4 mg)后体内空腹和餐后褪黑素药代动力学参数($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Fasting and postprandial melatonin pharmacokinetic parameters in 12 healthy subjects after oral administration of melatonin granules(2 g,containing melatonin 4 mg)

Parameter	Melatonin(Mean ± SD)	
	Fasting	Postprandial
$T_{\max}$ (h)	0.25 (0.08 - 0.42)	0.17 (0.08 - 2.50)
$C_{\max}$ (pg · mL ⁻¹)	29 759.26 ± 13 539.30	10 964.52 ± 5 355.90
$AUC_{0-\text{last}}$ (h · pg · mL ⁻¹)	22 092.46 ± 7 370.20	21 293.29 ± 9 497.20
$AUC_{0-\text{inf}}$ (h · pg · mL ⁻¹)	22 188.22 ± 7 371.20	21 449.91 ± 9 509.69
$t_{1/2}$ (h)	0.78 ± 0.16	1.06 ± 0.34
$CL_{\text{R/F}}$ (L · h ⁻¹)	0.20 ± 0.07	0.26 ± 0.21

讨 论

褪黑素颗粒经服用后在人体中产生有效物质为褪黑素,由于褪黑素为人体内源性物质,故要求方法有较低的定量下限测定本底浓度。目前测定生物样本中褪黑素的方法主要为LC-MS/MS法^[3-5]或GC-MS/MS法^[6],前处理操作使用复杂的液液萃取法^[4],采集时间长^[3,6]或定量下限高^[6]。本研究前期

在方法摸索过程中,通过筛选不同浓度乙酸铵(0.5~10 mM)-乙腈、不同浓度氟化铵(0.01~0.1 mM)-甲醇/乙腈等多种不同的系统,发现加入少量氟化铵后可以明显增加褪黑素的响应且峰形不拖尾,最终选择0.05 mM 氟化铵-乙腈作为流动相。本方法定量下限为50 pg · mL⁻¹满足测定给药前24 h褪黑素浓度要求,灵敏度低,线性范围广(1 000倍),可同时采用一个方法测定本底浓度和给药后的血药浓度。本研究通过健康人体药代动力学研究发现,服用相同剂量的儿童褪黑素颗粒后,餐后 $C_{\max}$ 为空腹的50%左右,餐后消除半衰期($t_{1/2}$)是空腹的1.4倍(1.06 vs. 0.78 h)但对比2者AUC值却非常接近,说明食物可能对褪黑素在体内的吸收及消除产生较明显影响。在糖尿病治疗研究中^[7],提出褪黑素与胰岛素有相互作用,因此推测餐后褪黑素吸收速率降低是由于高碳水饮食导致血糖上升,胰岛素分泌增加,促使色氨酸进入大脑转化为褪黑素,从而降低外源性褪黑素吸收速率。本文通过蛋白沉淀前处理,采用ESI(+)模式的UHPLC-MS/MS方法,建立了快速、高效、稳定的方法以测定内源性及服用褪黑素颗粒后人体血浆中褪黑素浓度的方法。适用于人体血浆样品中褪黑素浓度的测定及褪黑素药代动力学研究。

参考文献:

[1] 林育生. 失眠证中有关证候和症状的分析和研究[D]. 北京:北京中医药大学,2007.

[2] MUN J G, WANG D, DOERFLEIN FULK D L, et al. A randomized double-blind crossover study to investigate the pharmacokinetics of extended-release melatonin compared to immediate-release melatonin in healthy adults [J]. *J Diet Suppl*, 2024, 21(2): 182—194.

[3] DEMEUSE J J, emeuse, CALAPRICE C, HUYGHEBAERT L C, et al. Development and validation of an ultrasensitive LC-MS/MS method for the quantification of melatonin in human salivan [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2023, 34(6): 1056—1064.

[4] 王娟. 精神分裂症患者血浆中氨基酸类神经递质和褪黑素浓度检测的LC-MS/MS方法开发及其应用[D]. 辽宁 锦州:锦州医科大学,2023.

[5] 潘杰,周文佳,王蒙,等. 高效液相色谱-质谱法测定人血浆中褪黑素浓度[J]. *中国药理学杂志*, 2016, 51(9): 737—741.

[6] 周青,孙成文,王玲,等. 中毒患者血液中褪黑素浓度的气相色谱-串联质谱联用检测[J]. *中国卫生检验杂志*, 2020, 30(9): 2320—2322.

[7] 沙尔娜. 短期胰岛素强化治疗对新诊断2型糖尿病伴睡眠障碍患者的睡眠障碍及褪黑素水平的影响[D]. 新疆 乌鲁木齐:新疆医科大学,2019.

(收稿日期 2025-06-11)