

气相色谱-质谱选择离子检测法测定 失眠病人体内 Melatonin 的血药浓度

付良青¹, 骆传环², 舒 融²

(1. 军事医学科学院附属医院临床药理室, 北京 100039;

2. 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要:本文应用 GC/MS 仪, 采用内标咖啡因定量, 选择单离子检测建立了测定 Melatonin 的方法, Melatonin 的校正标准曲线为 $Y = 0.0582 + 0.6067X$ ($r = 0.9994$)。应用此法测定一例失眠病人在口服 20 mg Melatonin 后的血药浓度, 在服药后 1 小时达峰浓度 40.47 ng/mL, 且很快消除, 不会在体内蓄积。

关键词:褪黑激素; 失眠病人; 血药浓度; GC/MS; 单离子检测

中图分类号: O623.752; O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2002)01-0017-04

目前临床上使用最广泛的安眠药苯二氮卓类如安定及其衍生物, 它们在临床上发挥了重大的作用, 但研究及临床使用都表明, 苯二氮卓类药物半衰期长, 且母药及其代谢产物容易在体内发生累积, 长期服用容易产生剂量依赖性和成瘾性, 而久服骤停后, 常常出现复发性失眠以及戒断效应, 即出现悲痛、痉挛、耳鸣、出汗等症状, 而耐受性和戒断效应形成了又一个恶性循环, 这是苯二氮卓类药物自身所无法解决的矛盾。而且, 苯二氮卓类是通过 γ -氨基丁酸(GABA)受体抑制中枢神经系统而起作用的, 长期服用容易使人形成健忘症以及痴呆症。所以现在临床上急需一种新型的、高效的、低毒的安眠药。

褪黑激素(Melatonin)是人类大脑松果体分泌产生的一种吲哚类激素, 为内分泌系统的同步器, 有正常的昼夜节律, 即 Melatonin 的正常昼夜节律是人体健康的保证。尤其它与睡眠的关系引起了国内外的高度重视, 也对 Melatonin 的调节睡眠进行了充分的研究, 研究表明, Melatonin

有良好的催眠作用, 且因为它是内源性物质, 几乎无毒副作用, 对调整时差, 改善睡眠有积极的作用。

1 材料和方法

1.1 药品及试剂

Melatonin 人工合成, 对照品由美国 SIG-MA 公司购得, 内标咖啡因为进口分装。

1.2 生物样本的预处理

血清的制备: 血样放置半小时, 离心 3000 rpm, 30 min, 上层为血清。

血清中药物的提取分离: 在 1 mL 血清中加入 1 滴 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液、5 mL 的 CH_2Cl_2 振荡离心后, 两次提取的 CH_2Cl_2 层用氮气吹干, 加入 40 μL 0.25 ng/mL 的内标咖啡因甲醇溶液, 取 4 μL 进行测定。

1.3 失眠病人及实验设计

一例有 30 年失眠史的病人, 女性, 65 岁。于晚上 22:00 口服 20 mg Melatonin, 分别于服药

收稿日期: 2001-12-10

作者简介: 付良青(1971~), 女(汉族), 山西忻州人, 在读博士, 药理学研究

后 0、0.5、1、1.5、2、8、24 小时各时间点取静脉血 2 mL,按生物样本的预处理提取,用 GC-MS 进行测定。

1.4 仪器及条件

1.4.1 仪器

HP5890A (GC)—5970B (MSD)—59970C (Chem Station),OV-1 弹性石英毛细管柱($\Phi 0.2\text{ mm}\times 25\text{ m}\times 0.33\text{ mm}$)。

1.4.2 气相色谱条件

柱温 150—250 $^{\circ}\text{C}$,程序升温,升温速率:8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$;载气为 He,柱前压 10 PSI,流速 15 为 mL/min;进口温度:260 $^{\circ}\text{C}$,连接口温度:280 $^{\circ}\text{C}$;定性采用分流方式进样,分流比为 5:1;定量采用不分流进样。

1.4.3 质谱条件

电子轰击源(EI),离子聚焦电压 4V,电子倍增器电压 2400V,阈值 500,总离子流扫描质量范围; m/z 60~240;选择离子条件:194(3.5~8.8 min),173(8.8~11.5 min),194(15.5~20 min);Melatonin 和咖啡因的单离子检测分别选择它们的基峰 173、194 作选择离子检测,用这两个质谱峰的相对丰度之比作为响应对应于 Melatonin 浓度进行定量测定。

2 测定结果

将血样提取后, N_2 吹干,加甲醇 100 μL ,进样 4 μL 。分别进行 Melatonin、内标咖啡因的总离子流色谱-质谱分离及选择离子色谱-质谱分离。在此条件下,Melatonin 与内标物咖啡因能较好分离,Melatonin 和咖啡因的保留时间分别为 14.54、8.08 min。

3 方法考证

3.1 分析方法的线性范围及检测限

实验测得信噪比为 2 时的 Melatonin 的最小检测限为 0.5 ng/ μL ;在血样中 Melatonin 的线性范围内 10~400 ng/mL,Melatonin 的回归方程为 $Y=0.05820+0.6067X$,相关系数 $r=0.9994$ ($n=5$)。

3.2 回收率和精密度

3.2.1 回收率实验结果

血清中 5 个浓度 10、20、50、200、400 ng/mL

的回收率数据见表 1。Melatonin 在 10~400 ng/mL 浓度范围内,平均回收率为 85.46% $\pm$ 6.90%。

表 1 回收率实验测定结果(GC-MS)($n=4$)

Melatonin 浓度(ng/mL)	理论值 (相对丰度)	实测值 (相对丰度)	回收率(%)
10	0.7498	0.5581	74.4332
20	1.5144	1.3689	90.3922
50	3.6289	3.4253	94.3922
200	14.1896	11.6319	81.9760
400	28.5293	24.5626	86.00960

3.2.2 精密度测定

3.2.2.1 日内变异系数的测定

选 Melatonin 浓度为 20 ng/mL,10 个样品,提取方法见“生物样品的预处理”,测得其日内精密密度为 6.55%($n=10$)。

3.2.2.2 日间变异系数的测定

选 Melatonin 25 ng/mL,提取方法见“生物样品的预处理”,连续 4 天进样,每天三次进样,计算 Melatonin 质谱峰($m/z:173$)对于内标物咖啡因的质谱峰($m/z:194$)的相对丰度 A。测得其日间精密密度为 14.5%($n=10$)

4 口服 Melatonin 后的血药浓度测定

失眠病人在口服 20 mg 的 Melatonin 后,于设定时间点采血,按照生物样品的预处理方法提取后,进样测定失眠病人的血药浓度,表 2 为失眠病人的血药浓度。

表 2 人口服 Melatonin 后的血药浓度

药后时间(h)	浓度(ng/mL)
0	33.35
0.5	87.37
1	140.47
1.5	15.32
2	41.29
8	39.00
24	2.52

5 讨论

GC-MS 法综合了气相色谱较高的分离及定量能力和质谱较高的鉴别能力,在定性鉴定的基础上作定量分析,可排除体液中其它成分的干扰,在用选择离子检测时,灵敏度通常比一般色谱高两个数量级,可用于多组份混合物的定量性分析。我们采用的 GC-MS 联用仪测定血样中 Melatonin 的血药浓度方法,采用选择离子检测,内标法定量。血清中无干扰成分,专属性、选择性好,是一种实用的方法。失眠病人于口服 Melatonin 小时后达到峰浓度,吸收快、消除很快,不会在生物体内蓄积,是一种安全的药物,病人口述当晚睡眠好。但催眠有效时间较短,在临床用药中缓释剂型可能是一种合理的给药方式。

文献报道 Melatonin 起效快,容易发生消除,我们的实验结果与文献基本一致。

参考文献:

- [1] Raul V, Jesus M, Maria Lema, et al. Pineal and Plasma Melatonin as Determined by High-performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Analytical Biochemistry*, 1992, 205 (2): 300~305.
- [2] Tatsuo H, Hiroaki A, Shoji M. Simultaneous Determination of Serotonin, N-acetyl Serotonin and Melatonin in the Pineal Gland of the Juvenile Golden Hamster by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Journal of Chromatography B*, 1996, 675: 152~156.
- [3] Goldman ME, Hamn H, Erickson CK. Determination of Melatonin by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Journal of Chromatography*, 1980, 190: 217~220.
- [4] Alfred JL, Markey SP. Analysis of MLT in Human Plasma by Gas Chromatography Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Science*, 1978, 201: 741~743.
- [5] Aldnous M, Franey C, Wright J, et al. Plasma Concentrations of Melatonin in Man Following Oral Absorption of Different Preparations. *Br. J. Clin Pharmacol.*, 1985, 19: 517~521.
- [6] Olli V, Juhani L, Antti K. Oral Administration and Distribution of Melatonin in Human Serum, Saliva and Urine. *Life Science*, 1985, 37: 489~495.
- [7] Suzanne RV, Timo KK, George GK, et al. The Effect of Melatonin on Aqueous Humor Flow in Humans During the Day. *Ophthalmology*, 1994, 101(2): 326~331.
- [8] Alfred JL, Markey SP. Analysis of MLT in Human Plasma by Gas Chromatography Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Science*, 1978, 201: 741~743.
- [9] Greiner AC, Chan SC. Melatonin Content of the Human Pineal Gland. *Science*, 1978, 199(6): 83~84.
- [10] Iguchi H, Kato KI, Hayashi H. Melatonin Serum Levels and Metabolic Clearance Rate in Patients with Liver Cirrhosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1982, 54(5): 1025~1027.
- [11] Olli V, Juhani L, Antti K. Oral Administration and Distribution of Melatonin in Human Serum, Saliva and Urine. *Life Science*, 1985, 37: 489~495.
- [12] Suzanne RV, Timo KK, George GK, et al. The Effect of Melatonin on Aqueous Humor Flow in Humans During the Day. *Ophthalmology*, 1994, 101(2): 326~331.
- [13] Elizabeth AL, Howard BM. Pharmacokinetics of Melatonin in Man: First Pass Hepatic Metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1985, 61(6): 1214~1216.
- [14] John FP, Wei LD, Catherine AS, et al. High-Performance Liquid Chromatography Assay of Melatonin in Plasma with Fluorescence Detection. *Clinical Chemistry*, 1993, 39(11): 2242~2247.
- [15] Dawson D, Encel N. Melatonin Sleep in Humans. *J Pineal Res.*, 1993, 15(1): 1~12.
- [16] Jan JE, Espezel H, Appleton RE, et al. The Treatment of Sleep Disorders with Melatonin. *Dev Med Child Neurol*, 1994, 36(2): 97~107.
- [17] Dollins AB, Zhdanova N, Wurtman RJ, et al. Effects of Inducing Nocturnal Serum Melatonin Concentrations in Daytime on Sleep, Mood, Body Temperature, and Performance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(5): 1824~1828.
- [18] Wurtman RJ. Use of Melatonin to Induce Sleep. *PCT Int Appl WO 9407, 487, 14 Apr 1994*.

- [19] Waldhauser F, Saletu B, Trinchard-Lugan L. Sleep Laboratory Investigations on Hypnotic Properties of Melatonin. *Psychopharmacology* (Berlin), 1990, 100(2): 222~226.
- [20] Biella H, Fraschini F, Stakov B, et al. Melatonin Derivatives for Use in the Therapy of Sleep Disorders and in Pre-anaesthetic Mediation. *Eur Pat Appl EP513,702*. 19, Nov 1992.
- [21] Armstrong S M. Treatment of Sleep Disorders by Melatonin Administration. *Adv Pineal Res.*, 1991, 6: 263~274.

The Determination of Melatonin-Blood Concentration in a Patient by GC-MS-SIM

FU Liang-qing¹, LUO Chuan-huan², SHU Rong²

(1. Affiliated hospital, Academy of military medical sciences, Beijing 100039, China)

(2. Institute of radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: A method was set up by GC/MS-quantitative method with ISTD caffeine which can determine a new hypnosis drug---Melatonin. The Standard curve of Melatonin in blood is $Y = 0.0582 + 2.6067X$ ($r = 0.9994$). The blood concentration of Melatonin were determined in a patient after 20 mg Melatonin was administered, the C_{max} was 140.47 ng/mL at $T_{max} = 1h$, then Melatonin distributed and eliminated rapidly in the patient, and then not accumulate in the patient's body.

Key words: Melatonin; patient; blood concentration; GC/MS; SIM

=====

(上接第 16 页)

The Application of GC/MS/MS to Screening for Drugs of Abused in Hair

SHEN Min, SHEN Bao-hua, XIANG Ping

(Institute of Forensic Sciences, Ministry of Justice, Shanghai 200063, China)

Abstract: A screening system was established for simultaneous detection of abused drugs in hair by GC/MS/MS. The results showed that tandem mass spectrometry (MS/MS) technique can effectively reduce the background due to complex matrixes by excluding all unwanted ions except the parent ion, and has advantages of high sensitivity of SIS and structural information of scan. The recoveries of 13 abused drugs range from 68 to 101%, with low limits of detection (0.01~2ng/mL hair).

Key Words: abused drugs; screening system; hair analysis; GC/MS/MS