

膠囊錠狀食品中褪黑激素(melatonin)檢驗方法之探討

黃振翔 黃詩珊 蔡麗瑤 蔡佳芬 陳惠芳

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

褪黑激素為腦部松果腺所分泌的荷爾蒙，於人體之天然含量極低，卻具有藥理活性，本研究建立以高效液相層析法搭配光二極體陣列檢測器(HPLC/PDA)，分析膠囊錠狀食品中褪黑激素(melatonin)含量之方法。膠囊錠狀食品經甲醇萃取過濾後，採用C18層析管柱，以乙腈及0.085%磷酸溶液為移動相溶液進行梯度沖提，於波長220 nm進行高效液相層析分析。褪黑激素標準曲線之線性關係良好(濃度0.03 - 85.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，其判定係數(r^2)均於0.999以上。同日內與異日間試驗之相對標準偏差(RSD)分別為0.05 - 0.14%及0.40 - 0.50%。於檢體中添加褪黑激素8.35 - 167.48 ppm，其平均回收率介於79.5 - 92.4%，相對標準偏差(RSD)介於0.19 - 1.94%，而定量極限與偵測極限分別為15.0及3.0 ppm。應用本方法於市售成分組成均不同之27件標示含有褪黑激素檢體之分析，僅1件檢體之層析圖譜仍見些微干擾，針對該檢體進行個別層析條件調整後，亦可成功分離，其餘檢體之層析圖譜均無干擾之情形，顯示本研究建立之高效液相層析法對於市售含褪黑激素產品之分析結果良好，可供各界進行褪黑激素檢測之參考。

關鍵詞：褪黑激素、高效液相層析

前言

褪黑激素為腦部松果腺所分泌的荷爾蒙，其分泌會受到光線影響，晚間入睡後其含量會逐漸升高，於早晨醒來時會逐漸降低，其含量多寡可以影響睡眠周期⁽¹⁾，市面上不乏含有褪黑激素以改善睡眠或調整時差的產品。褪黑激素於人體之天然含量極低，但具有藥理活性，在許多國家被拿來治療睡眠障礙及改善時差徵狀⁽²⁾，根據85年10月15日衛署藥字第85059553號公告「標示含melatonin (褪黑激素)」之產品應以藥品管理，其製造、輸入及販售應符合藥事法之規定⁽³⁾。另根據本署「可供食品使用原

料彙整一覽表」規定⁽⁴⁾，以牛、羊、豬等家畜腦內松果腺直接乾燥製成之粉末，可供食品原料使用，惟其褪黑激素天然含量應為20 ppm以下，並須有加工方式備供衛生單位查核⁽⁵⁾。

在我國褪黑激素雖為藥品管理，但倘若其天然含量在20 ppm以下，仍可當作食品原料來使用。為了準確測定市售食品中褪黑激素之含量，本研究利用高效液相層析儀搭配光二極體陣列檢測器(HPLC/PDA)建立褪黑激素之檢驗方法，並以國外市售含有褪黑激素成分之膠囊錠狀食品進行其適用性之評估，未來可供作例行性檢驗之依據，以維護民眾食用相關食品之安全與健康。

材料與方法

一、材料及試藥

採集市售含褪黑激素成分之膠囊(12件)及錠狀(15件)食品，共27件檢體。Melatonin對照用標準品購自美國Sigma公司(St. Louis, MO, USA)。甲醇、乙腈及磷酸(85%)均使用試藥特級或特級品，購自德國Merck公司(Darmstadt, Germany)。

二、儀器設備

高效液相層析儀(e2695 separations Module, Waters Co., Milford, MA, USA)、純水製造機(Milli-Q SP Advantage A10 System, Millipore Ltd., Bedford, MA, USA)及超音波振盪器(Elma D-78224, Singen, Germany)。

三、方法

(一)基質粉末配製

錠狀膠囊狀食品模擬賦形劑：澱粉24%、玉米澱粉24%、羧甲基丙基纖維素24%、乳糖24%、二氧化矽2%及硬脂酸鎂2%。依上述比例配製成基質粉末。

(二)測試樣品製備

取基質粉末1 g，加入褪黑激素標準溶液(167.5 µg/mL) 1 mL，再以真空減壓乾燥1小時，供作測試樣品。

(三)最佳萃取溶液探討

以甲醇、95%乙醇溶液、70%甲醇溶液、66.5%乙醇溶液、丙酮、丙酮：甲醇(1:3, v/v)溶液及磷酸：乙腈(3:1, v/v)溶液等7種不同萃取溶液，分別對測試樣品進行3重複萃取試驗之比較。

(四)溶液配製

1. 標準原液之配製：取melatonin對照用標準品約1.7 mg，精確稱定，置於20 mL容量瓶中，加入甲醇溶解並定容之，供

作標準原液。

2. 檢液之調製：將錠劑或膠囊內容物研磨混合均勻後，精確稱取1.0 g，加入甲醇20 mL，以超音波振盪萃取30分鐘後，過濾，重複萃取1次，合併濾液，定容至50 mL，供作檢液。

3. 0.085%磷酸溶液之配製：取磷酸1 mL置於1000 mL定容瓶中，以去離子水定容，均勻混合後以濾膜過濾。

(五)高效液相層析條件

層析管柱為GL Sciences Inertsil® ODS - 2 (4.6 × 250 mm, 5 µm)；移動相為(A)乙腈，(B) 0.085%磷酸溶液進行梯度沖提(如表一)；移動相流速0.9 mL/min；管柱溫度30°C；檢測波長220 nm；注入體積20 µL。

表一、梯度分析條件

時間(min)	A (%)	B (%)
0	10	90
10	15	85
20	19	81
35	25	75
38	100	0
43	100	0
46	10	90
50	10	90

(六)標準曲線製作

精確量取melatonin標準原液，以甲醇進行序列稀釋，使melatonin濃度於0.03 - 85.35 µg/mL，注入高效液相層析儀分析之。

(七)同日內及異日間試驗

於標準溶液檢量線範圍內，分別選擇檢體20、檢體6及檢體27代表高中低三種不同濃度，於同1日及不同的3日以HPLC各分析3次，並將所得之數據計算相對標準偏差(RSD)。

(八)添加回收試驗

量取序列melatonin標準溶液各1 mL，分別加入1 g基質粉末中，使其於基質粉末中之最終濃度為8.35、41.79、83.34、116.54及167.48 ppm，真空減壓乾燥1小時，作為添加回收試驗之試驗樣品。前述樣品依(四)2.檢液之調製步驟處理，分別注入HPLC分析之，重複操作5次，並計算所得數據之回收率及相對標準偏差(RSD)。

(九)偵測極限(limit of detection, LOD)與定量極限(limit of quantification, LOQ)

取基質粉末1 g，分別加入1 mL不同濃度之melatonin標準溶液，真空減壓乾燥1小時。乾燥後之檢品依照上述(四)2.檢液之調製步驟處理，作為偵測極限及定量極限試驗之試驗溶液，各試驗溶液分別注入HPLC分析之。就所得之波峰訊號強度計算其訊噪比(S/N ratio)，以訊噪比大於3為方法之偵測極限，訊噪比大於10為方法之定量極限。

(十)市售檢體褪黑激素定量

市售27件檢體分別依(四)2.檢液之配製步驟處理後，並以HPLC分析之，重複3次，並將所得之數據計算其褪黑激素含量。

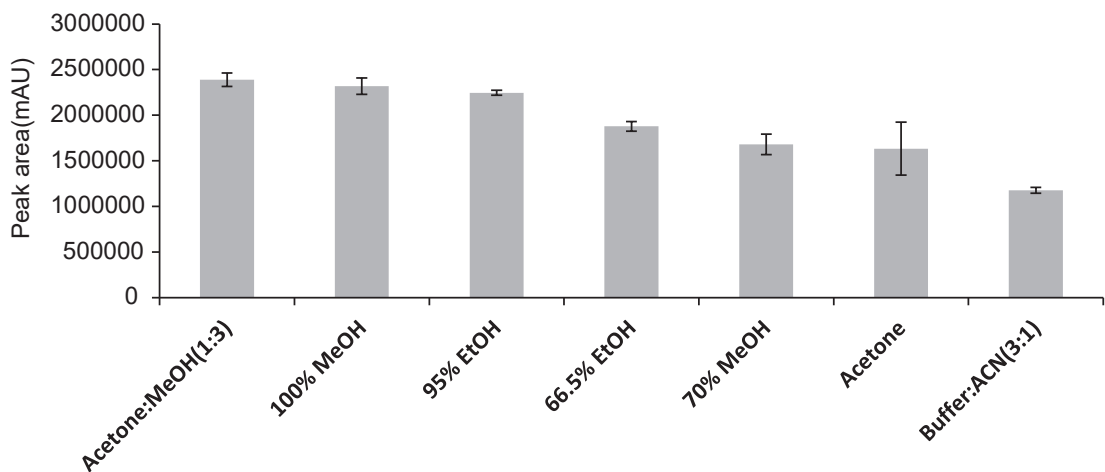
結果與討論

一、萃取溶液之選擇

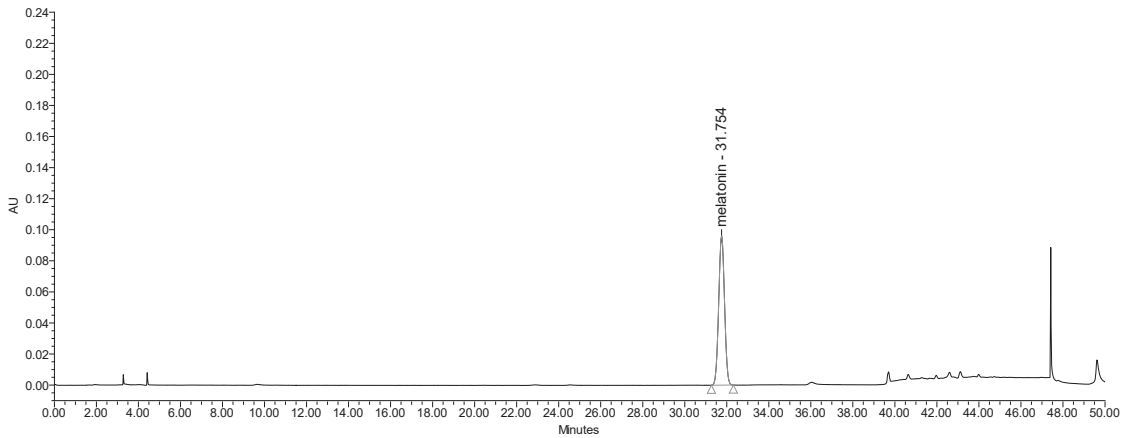
以7種不同萃取溶液，分別對測試樣品進行3重複萃取試驗，實驗結果顯示，甲醇及丙酮：甲醇(1:3, v/v)溶液對於褪黑激素有最佳萃取效果，將前述兩者所得之實驗數據進行顯著性分析，結果顯示兩者在統計上並無顯著差異，故選擇甲醇做為實驗所使用之萃取溶液(圖一)。

二、高效液相層析條件之選擇

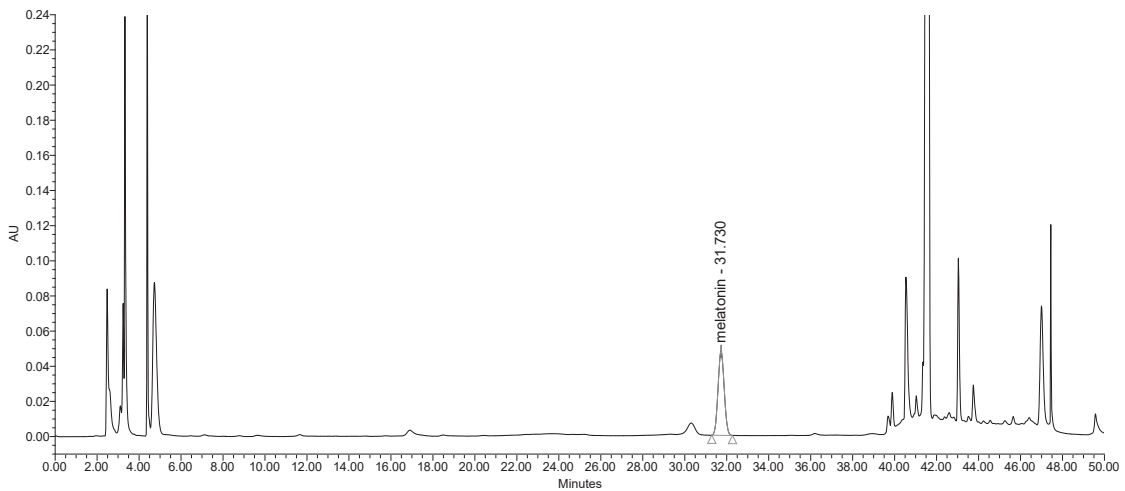
本實驗以多種不同比例之乙腈與0.085%磷酸溶液為移動相，並以Inertsil® ODS - 2及Inertsil® ODS - SP等不同種類之層析管柱，進行27件含褪黑激素成分食品之測試。結果顯示，使用Inertsil® ODS - 2搭配表一之梯度沖提條件時，在27件檢體中，僅有1件檢體無法成功將褪黑激素與雜訊分離，針對該檢體進行個別調整後，亦可成功分離之，故以此為最適層析條件，褪黑激素標準品及樣品(檢品23為例)之層析圖譜如圖二及圖三所示。



圖一、不同溶液對於褪黑激素之萃取效果



圖二、褪黑激素標準溶液之HPLC圖譜



圖三、錠狀食品(檢體編號23)中褪黑激素之HPLC圖譜

三、標準曲線之製作

褪黑激素標準曲線依照濃度不同分為高、低兩濃度範圍，其標準曲線迴歸方程式及決定係數(r^2)分別為：高濃度(濃度4.27 - 85.35 $\mu\text{g/mL}$)， $y = 142194x + 3604.5$ ，0.9997；低濃度(濃度0.03 - 6.40 $\mu\text{g/mL}$)， $y = 137890x - 5057.6$ ，0.9994。其決定係數均於0.999以上，顯示其在高低濃度區間均有良好線性關係。

四、同日內及異日間試驗

選擇3個檢體分別代表低、中、高(0.24、2.27、3.96 mg/g)濃度，於同1日及不同的3日連續分析3次。褪黑激素分析結果如表二所示，其同日內之相對標準偏差(RSD)介於0.05 - 0.14%，異日間之相對標準偏差(RSD)則介於0.40 - 0.50%，顯示本方法具有良好的再現性與精密度。

表二、褪黑激素同日內與異日間試驗結果

濃度	Intraday ^a		Interday ^a	
	Mean ± SD	(RSD, %) ^a	Mean ± SD	(RSD, %) ^a
高	3.96 ± 0.005	(0.12)	3.98 ± 0.02	(0.40)
中	2.27 ± 0.003	(0.14)	2.28 ± 0.01	(0.43)
低	0.24 ± 0.0001	(0.05)	0.25 ± 0.001	(0.50)

a. n = 3

五、添加回收試驗

於基質粉末中添加5種濃度之褪黑激素標準溶液，經由萃取回收後，其結果如表三，褪黑激素回收率為79.52 - 92.42%，相對標準偏差(RSD)介於0.19 - 1.94%，其回收率符合食藥署建議之食品化學檢驗方法之確效規範⁽⁶⁾，顯示此分析方法具有高度準確性。

六、偵測極限及定量極限之評估

褪黑激素檢液之偵測極限及定量極限分別為0.06及0.30 µg/mL，若將其推算於檢體含量則分別為3.0及15.0 ppm。

七、市售含褪黑激素檢體之定量

市售27件標示含褪黑激素成分之檢體定量結果整理如圖四，檢視產品標示含量可以發現，27件檢體中有1件檢體褪黑激素含量小於

表三、Melatonin添加回收試驗結果

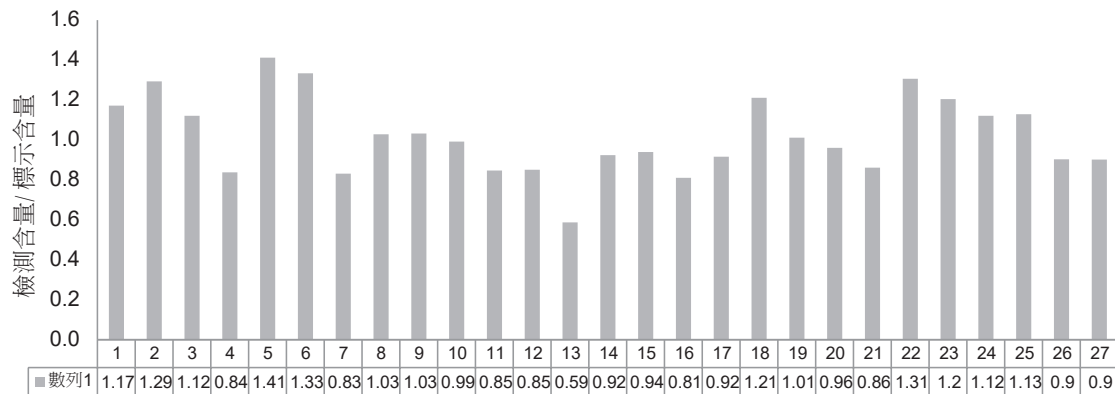
Spiked Conc. (ppm)	Recovery ^a (%)	Mean ± SD (ppm)	RSD (%)
167.48	84.41	141.38 ± 0.27	0.19
116.54	79.52	92.67 ± 0.36	0.38
83.34	84.01	70.02 ± 0.50	0.71
41.79	84.96	35.51 ± 0.49	1.38
8.35	92.42	7.72 ± 0.15	1.94

a. n = 5

標示含量的80%，有6件檢體介於80 - 90%，有10件檢體介於90 - 110%，介於110 - 120%及超過120%則各有5件。

結 論

本研究建立以HPLC/PDA分析膠囊錠狀食品中褪黑激素含量之檢驗方法，此方法之前處理操作簡便，其回收率、重複性及靈敏度良好，應用本方法於27件檢體之分析，僅1件檢體之層析圖譜仍見些微干擾，針對該檢體進行個別調整後，亦可成功分離，其餘檢體之層析圖譜均無干擾之情形。本方法之定量極限可達15.0 ppm，亦可用於以牛、羊、豬等家畜腦內松果腺直接乾燥物為食品原料產品之檢驗(其褪黑激素天然含量應為20.0 ppm以下)，故本方



圖四、市售27件標示含褪黑激素成分檢體之檢測含量與標示含量之比較

法可供作褪黑激素產品檢驗之參考。

參考文獻

1. Brainard, G. C., Hanifin, J. P., Greeson, J. M. and *et al.* 2001. Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. *J. Neurosci.* 21(16): 6405-6412.
2. Rios, E. R. V., Venâncio, E. T., Rocha, N. F. M. and *et al.* 2010. Melatonin: pharmacological aspects and clinical trends. *Int. J. Neurosci.* 120: 583-590.
3. 行政院衛生署。1996。有關褪黑激素管理原則。85.10.15衛署藥字第85059553號公告。
4. 食品藥物管理署。2015。有關禽、畜類及其來源製取之原料。104.10.31。可供食品使用原料彙整一覽表。
[<http://consumer.fda.gov.tw/Food/Material.aspx?nodeID=160>]。
5. 食品藥物管理局。2012。含褪黑激素(melatonin)成分產品之管理原則。藥物食品安全週報第372期。
6. 食品藥物管理局。2012。食品化學檢驗方法之確效規範(第二次修正公布)。食品藥物管理署官網[<http://www.fda.gov.tw>]業務專區/研究檢驗/檢驗方法溝通平台。

Determination of Melatonin in Foods in Capsule or Tablet form

CHEN-HSIANG LAIO, SHIH-SHAN HUANG, LI-YAO TSAI,
CHIA-FEN TSAI AND HWEI-FANG CHENG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

Melatonin is a natural hormone secreted by pineal gland in the mammalian brain. Although the content of melatonin is considerably low in human body, it still possesses pharmacological activity. A method for the analysis of melatonin in foods in capsule or tablet form by high performance liquid chromatography/photodiode array detector (HPLC/PDA) was developed. Methanol was applied for the extraction of melatonin from foods. The extracts were analyzed by a HPLC/PDA system consisted of a C18 column and gradient mobile phase of acetonitrile and 0.085% H₃PO₄. The detection wavelength was 220 nm. The method demonstrated good linearity at melatonin concentration range of 0.03 - 85.35 µg/mL, with a determination coefficient (r^2) above 0.999. The recovery studies were conducted by spiking melatonin into blank samples at the concentration range of 8.35 - 167.48 ppm. The average recoveries, relative standard deviations (RSDs) of intraday and interday recovery studies, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 79.5 - 92.4%, 0.05 - 0.50%, 3.0 ppm and 15.0 ppm respectively. The method selectivity was tested in 27 commercial products. The results showed only 1 sample revealed chromatographic interference which was resolved after manual adjustment. This report provides a reference method for administrative authorities and the public.

Key words: melatonin, high performance liquid chromatography