

分析测试新成果 (299 ~ 303)

# 顶空气相色谱-电子捕获检测器法测定明胶空心胶囊中 2-氯乙醇残留量

程磊<sup>1</sup>, 郭文旭<sup>1,2</sup>, 王丹丹<sup>1</sup>, 陈超<sup>1</sup>

(1. 浙江省食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310052; 2. 中国药科大学, 江苏 南京 210009)

**摘要:** 建立明胶空心胶囊中 2-氯乙醇残留量的顶空气相色谱-电子捕获检测器分析测定方法。明胶空心胶囊溶液经 NaCl 溶液盐析后失去明胶的物理性质, 采用顶空气相色谱-电子捕获检测器对明胶空心胶囊溶液中 2-氯乙醇含量进行分析。试验结果表明, 2-氯乙醇在 10~35  $\mu\text{g/g}$  范围内呈良好线性关系,  $r$  为 0.999 4, 定量限和检出限分别为 10 和 5  $\mu\text{g/g}$ , 回收率为 92.1%~102.2%, 相对标准偏差(RSD)均小于 10%, 使用所建立的方法对样品进行了检验。方法简单准确, 灵敏度高, 有效解决了明胶空心胶囊基质效应, 可用于市售明胶空心胶囊中 2-氯乙醇的定量分析。

**关键词:** 明胶空心胶囊; 2-氯乙醇; 盐析; 气相色谱-电子捕获检测器; 顶空气相色谱

中图分类号: O657.7<sup>+1</sup>

文献标志码: B

文章编号: 1006-3757(2023)03-0299-05

DOI: 10.16495/j.1006-3757.2023.03.008

## Determination of 2-Chloroethanol Residues in Gelatin Hollow Capsules by Headspace Gas Chromatography-Electron Capture Detector Method

CHENG Lei<sup>1</sup>, GUO Wenxu<sup>1,2</sup>, WANG Dandan<sup>1</sup>, CHEN Chao<sup>1</sup>

(1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China;

2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** A method was developed to determine the residues of 2-chloroethanol in gelatin hollow capsules using headspace gas chromatography-electron capture detector method. The physical properties of gelatin disappeared when the gelatin hollow capsule solution was salting out with NaCl solution. The content of 2-chloroethanol in gelatin hollow capsule solution was analyzed by headspace gas chromatography-electron capture detector method. The results showed that 2-chloroethanol had a good linear relationship in the range of 10~35  $\mu\text{g/g}$ , with an  $r$  value of 0.999 4. The limits of quantitation and limits of detection were 10 and 5  $\mu\text{g/g}$ , respectively. The recoveries ranged from 92.1%~102.2%, the relative standard deviation (RSD) were all less than 10%. The samples were tested by the method. The method is simple, accurate and sensitive and effective in solving the matrix effect of gelatin hollow capsules, and can be used for the quantitative analysis of 2-chloroethanol in commercially available gelatin hollow capsules.

**Key words:** gelatin hollow capsules; 2-chloroethanol; salting out; gas chromatography-electron capture detector; headspace gas chromatography

由于明胶空心胶囊具有掩盖药物气味、提高生物利用度和制作缓释试剂等特性, 已经成为应用最广泛的药用剂型之一。明胶空心胶囊是采用动物(主

要为猪、牛)皮、骨、筋腱中的胶原质, 通过部分碱和/或酸解、酶解、热解提纯制得的蛋白质制品<sup>[1]</sup>。明胶空心胶囊的质量安全一直是世界用药安全问题

收稿日期: 2023-07-06; 修订日期: 2023-08-15.

作者简介: 程磊(1988-), 男, 助理工程师, 主要从事药用辅料及药品包装材料的研究, E-mail: cl185186867@163.com

通信作者: 王丹丹(1982-), 女, 副主任药师, 主要从事药用辅料及药品包装材料的研究, E-mail: bailifenlan2009@126.com.

的焦点,作为蛋白质品,其中细菌的控制尤为重要,因此,灭菌成为整个胶囊生产工艺中必不可少的环节之一.在某些生产工艺中,廉价的环氧乙烷被用作明胶空心胶囊的灭菌剂<sup>[2]</sup>,环氧乙烷的消毒特性来源于其高挥发性和反应性,这导致环氧乙烷消毒后产生潜在的衍生物,包括 1,4-二氧六环、乙醛和卤代乙醇<sup>[3]</sup>.因此,环氧乙烷在明胶空心胶囊中主要以其衍生物形式存在.2-氯乙醇(2-CE)是环氧乙烷的主要衍生物,也是明胶空心胶囊中最易残留的杂质之一.

欧盟已明确规定禁止使用环氧乙烷对胶囊产品进行熏蒸消毒,并将环氧乙烷和 2-CE 的最大残留量同时进行限定,但在许多食品检验中,仅观察到 2-CE 的残留物,不存在环氧乙烷.厂家表明,食品中可能存在 2-CE,与非法使用环氧乙烷作为熏蒸剂/消毒剂无关<sup>[4]</sup>.近期通过结构活性关系和体外测试方法验证了 2-CE 不具备遗传毒性,也不是啮齿动物致癌物<sup>[5]</sup>.因此有必要将 2-CE 进行单独质量限定以提高检测效率,而不是向环氧乙烷的限度标准看齐.欧洲与中国均对 2-CE 最大残留量进行严格限定,《中华人民共和国药典》2020 版规定:明胶空心胶囊中 2-CE 限度为 20 mg/kg<sup>[6]</sup>,采用直接进样气相色谱-火焰离子化检测器(GC-FID)法对 2-CE 含量进行测定.但该方法前处理较麻烦,仪器信号不够灵敏,不仅大幅降低了检验效率,还增加了有机试剂的损耗.欧洲对 2-CE 的最大残留限量尤为严格,采用德国开发的测定 2-CE 的方法<sup>[7]</sup>,将其 2-CE 与环氧乙烷(EO)共同衍生化为 2-碘乙醇,再通过气相色谱-电子捕获检测器(GC-ECD)方法进行检测<sup>[8]</sup>.2020 年,欧盟收到越来越多关于芝麻(特别是印度芝麻)中存在环氧乙烷的通知,要求对所有批次中的 50% 进行检测.与此同时,基于分散固相萃取样品制备技术(QuEChERS)、固相萃取(SPE)纯化和气相-质谱/质谱(GC-MS/MS)开发了一种更精确、高通量的方法<sup>[9]</sup>,该方法虽然可以实现 2-CE 的痕量测定,但是该方法主要用于进口香料、芝麻等食品的测定,操作步骤繁琐,回收率低,不适用于具有胶凝特性的胶囊产品,并且其需要使用 MS/MS 进行痕量分析,可能在许多实验室中不容易实现.

因此,开发一种适合形势发展的 2-CE 检测手段尤为重要.本文以 2-CE 中的氯原子为抓手,以顶空进样方式,建立了气相色谱-离子检测器测定明胶

空心胶囊中 2-CE 含量的方法.将顶空 GC-ECD 与 GC-FID 的测定结果进行比较,顶空 GC-ECD 方法前处理简单、检测灵敏度高,大幅提升了明胶空心胶囊中 2-CE 含量的检测效率.

## 1 试验部分

### 1.1 仪器与试剂

GC-2010Plus 岛津气相色谱仪,配备 HS-20 顶空进样器(日本岛津公司);ECD 检测器及 FID 检测器均为日本岛津公司;色谱柱 DB-624(30 m×0.320 mm×1.8 μm)、色谱柱 HP-5(30 m×0.320 mm×0.25 μm)、色谱柱 HP-INNOWAX(30 m×0.320 mm×0.25 μm)均产自美国 Agilent 公司;ML304T 电子天平(梅特勒托利多公司);Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司).

2-CE 对照品溶液(广州佳途科技股份有限公司,批号:202209010035,浓度:5 000 mg/L 水溶液);NaCl(国药集团化学试剂有限公司,批号:20220107,纯度:99.5%);Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(国药集团化学试剂有限公司,批号:20221209,纯度:99.0%);NH<sub>4</sub>Cl(国药集团化学试剂有限公司,批号:20220213,纯度:99.5%);超纯水;10 批来自不同厂家生产的明胶空心胶囊样品.

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 顶空和色谱条件

顶空条件:顶空平衡温度为 90 °C,定量环温度为 95 °C,传输线温度为 100 °C,顶空平衡时间 30 min.

色谱条件:气相毛细管色谱柱 DB-624(30 m×0.320 mm×1.8 μm);色谱柱温度 105 °C,维持 20 min;检测器温度 300 °C;载气采用氮气;色谱柱流量 0.3 mL/min;吹扫流量 3.0 mL/min;分流比 10 : 1.

#### 1.2.2 溶液配制

空白溶液的配制:取 NaCl 固体 150 g,精密称定,置于 500 mL 烧杯中,加水至 500 mL,搅拌至完全溶解,取 5 mL 混合溶液于 20 mL 顶空瓶中作为空白溶液.

对照品溶液的配制:精密量取 2-CE 对照品溶液 40 μL,置于 50 mL 量瓶中,采用含 30% NaCl 的水溶液稀释至刻度,振摇,取 5 mL 混合溶液于 20 mL 顶空瓶中,即得对照品溶液.

供试品溶液的配制:取明胶空心胶囊样品 1.0 g,压扁,精密称定,置于 20 mL 顶空瓶中,加入 5 mL 含 30% NaCl 的水溶液,作为供试品溶液.

纯水对照溶液的配制:精密量取 2-CE 对照品溶液 40  $\mu\text{L}$ ,置于 50 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,作为纯水对照溶液。

基质溶液的配制:取 3 份明胶空心胶囊样品各 1.0 g,压扁,精密称定,置于 20 mL 顶空瓶中,加入 5 mL 纯水对照溶液,作为基质溶液。

## 2 结果与讨论

### 2.1 基质效应

分别取 3 份基质溶液,与纯水对照溶液同时进样,结果如表 1 所列。

表 1 纯水溶液中的基质效应

Table 1 Matrix effect of pure aqueous solution

| 溶液     | 峰面积   | 与纯水对照溶液的峰面积比值 |
|--------|-------|---------------|
| 纯水对照溶液 | 5 353 | 1.00          |
| 基质溶液-1 | 3 829 | 0.71          |
| 基质溶液-2 | 3 866 | 0.72          |
| 基质溶液-3 | 3 771 | 0.70          |

由表 1 可见,明胶空心胶囊溶于水后基质效应明显,2-CE 在胶囊溶液中被明胶所包埋,导致检测时响应信号降低,无法将 2-CE 完全释放。作为溶剂,纯水也存在沸点低、伤害检测器的问题。因此,本试验采用饱和盐溶液对明胶空心胶囊溶液中的明胶蛋白盐析,使其无法维持三螺旋结构,从而使胶囊溶液失去胶体性质,阻止其包埋 2-CE,同时可提高溶剂沸点,减小基质效应的影响。

### 2.2 盐的选择

按 1.2.2 项下盐对照溶液处理方法,由于 30% 盐在水溶液中基本饱和,因此分别选择 30% NaCl、30%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、30%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  作为盐析剂,研究对水基类基质样品的盐析效果。结果如图 1 所示。

由图 1 可见,三种盐溶液中 NaCl 对明胶胶囊盐析作用效果明显,可有效提高回收率,又考虑到 NaCl 溶液获取简单、容易配制、价格低,因此本试验选择 NaCl 溶液为盐析试剂。

### 2.3 顶空条件优化

#### 2.3.1 顶空平衡温度优化

根据《中华人民共和国药典》2020 版 0861 残留溶剂测定法<sup>[10]</sup>项下说明,顶空平衡温度一般应比溶解供试品所用溶剂的沸点低 10  $^{\circ}\text{C}$  及以下,能满足

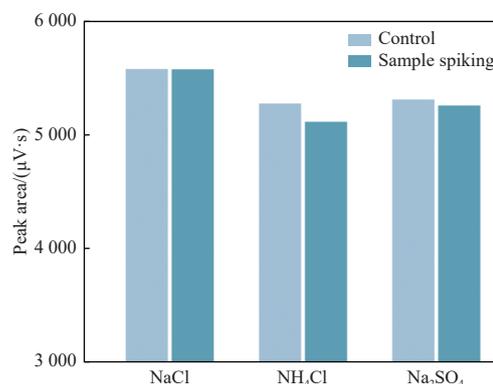


图 1 30% NaCl、30%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、30%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶液对照与加标峰面积比较

Fig. 1 Comparison of spiked peak areas of 30% NaCl, 30%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 30%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  salt solutions

检测灵敏度即可。鉴于 NaCl 溶液沸点近似为 110  $^{\circ}\text{C}$ ,因此采用 90  $^{\circ}\text{C}$  作为顶空平衡温度。

#### 2.3.2 顶空平衡时间优化

取 1.2.2 项下对照溶液各 12 份,分别在 90  $^{\circ}\text{C}$  下保温 10、20、30、60 min,每组 3 份,按 1.2.1 项下方法进样,记录 2-CE 的峰面积。以峰面积为纵坐标,时间为横坐标作柱状图,结果如图 2 所示。

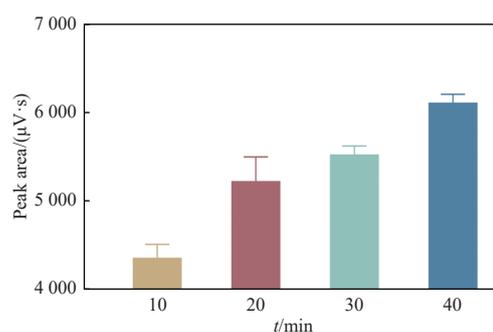


图 2 2-CE 顶空时间考察

Fig. 2 Study on headspace times of 2-CE

由图 2 可见,2-CE 的峰面积随顶空时间增长而增大,且 30 min 前测定结果的相对标准偏差(RSD)偏大,可能是顶空瓶中未达到平衡导致结果差距较大,说明 2-CE 对照品在 90  $^{\circ}\text{C}$  下,可以在 30~60 min 达到平衡。由于 30 min 已达到检测要求,因此综合考虑选择 30 min 为平衡保温时间。

### 2.4 色谱条件优化

#### 2.4.1 色谱柱选择

本方法选用 3 种不同类型的色谱柱对 2-CE 的分离度、响应和峰形等方面进行评估比较,探究适

合该检测方法的色谱柱. 分别采用弱极性 HP-5 毛细管柱、中等极性 DB-624 毛细管柱、强极性 HP-INNOWAX 毛细管柱在相同分析条件下, 对同一浓度的对照品溶液进行测定. 结果显示, HP-INNOWAX 柱对 2-CE 保留效果较强、出峰时间慢, 不符合高效检测的改进理念. HP-5 柱中, 对 2-CE 几乎不保留, 出峰最快, 但与溶剂峰相近. 而 DB-624 柱能在 15 min 内分离 2-CE, 且峰形尖锐、响应值高, 并且可以准确定量. 因此, 本试验选用 DB-624 毛细管柱对 2-CE 进行分析测试, 其色谱图如图 3 所示.

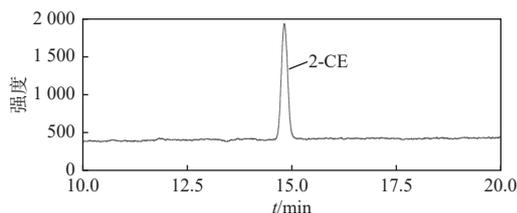


图 3 20 µg/g 2-CE 对照溶液谱图

色谱条件: DB-624 (30 m × 0.320 mm × 1.8 µm) 色谱柱, 105 °C 柱温, ECD 检测器温度为 300 °C, 色谱柱流量为 0.3 mL/min

Fig. 3 Chromatogram of 20µg/g 2-CE

chromatographic conditions: chromatographic column used as DB-624 (30 m × 0.320 mm × 1.8 µm), column temperature of 105 °C, temperature of ECD detector of 300 °C, flow rate of 0.3 mL/min

#### 2.4.2 检测器选择

本方法比较了 2 种不同类型的检测器对 2-CE 的信号灵敏度, 分别使用 FID 与 ECD 在相同参数条件下, 对一样品溶液进行测定, 结果如图 4、5 所示.

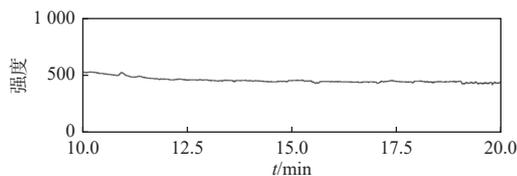


图 4 样品溶液在 ECD 中色谱图

色谱条件: 色谱柱 DB-624 (30 m × 0.320 mm × 1.8 µm), 柱温 105 °C, ECD 检测器温度为 300 °C, 色谱柱流量为 0.3 mL/min

Fig. 4 Chromatogram of sample solution in ECD

chromatographic conditions: chromatographic column used as DB-624 (30 m × 0.320 mm × 1.8 µm), column temperature of 105 °C, temperature of ECD detector of 300 °C, flow rate of 0.3 mL/min

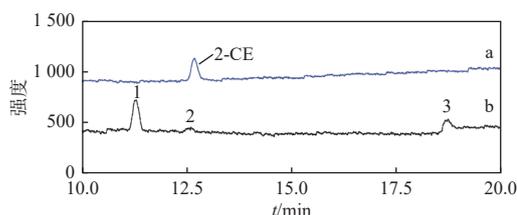


图 5 2-CE 及样品溶液在 FID 中色谱图

(a) 2-CE, (b) 样品, (1)~(3) 均为杂峰  
色谱条件: DB-624 (30 m × 0.320 mm × 1.8 µm) 色谱柱, 105 °C 柱温, FID 检测器温度为 300 °C, 色谱柱流量为 0.3 mL/min

Fig. 5 Chromatograms of 2-CE and sample solution in FID

(a) 2-CE, (b) sample, (1)~(3) all impure peaks  
chromatographic conditions: chromatographic column used as DB-624 (30 m × 0.320 mm × 1.8 µm), column temperature of 105 °C, temperature of FID detector of 300 °C, flow rate of 0.3 mL/min

由图 4、5 结果可见, 样品溶液在 FID 下存在杂峰, 且杂峰与 FID 中 2-CE 对照品出峰时间接近, 影响结果的判断. 相反, 样品溶液在 ECD 下无明显杂峰, 且同浓度的 2-CE 对照品在 ECD 检测器中峰形尖锐且明显. 因此采用 ECD 检测明胶空心胶囊中 2-CE 方法较可靠.

## 2.5 方法学

### 2.5.1 线性关系考察

取对照品溶液, 按 10~35 µg/g 配制 5 份不同浓度的对照品标准曲线溶液. 以浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 得回归方程:  $Y = 254.3X + 921$ , 相关系数  $r$  为 0.999 4. 表明 2-CE 在 10~35 µg/g 范围内呈良好线性关系.

### 2.5.2 检测限

将对照品溶液逐步用水稀释, 依法进样测定. 分别以信噪比(S/N)为 10 和 3 确定定量限和检出限, 其分别为 10 和 5 µg/g.

### 2.5.3 仪器精密度

取对照品溶液连续进样 6 次, 记录 2-CE 峰面积, 结果显示: 2-CE 峰面积的 RSD 为 1.90%, 表明仪器精密度较好.

### 2.5.4 重复性

取 6 份明胶空心胶囊样品各 1.0 g, 精密称定, 添加 100% 浓度对照品溶液, 进样分析, 记录 2-CE 峰面积. 结果显示: 2-CE 峰面积的 RSD 为 1.94%,

说明重复性较好。

### 2.5.5 回收率

精密称取明胶空心胶囊样品各 1.0 g, 分别添加低、中、高浓度的对照品溶液, 每个水平做 3 次平行试验, 按 1.2.2 项下供试品溶液配制条件, 按照 1.2.1 项下条件进样测定, 计算平均回收率, 结果如表 2 所列。

表 2 2-CE 回收率测定结果

Table 2 Determination results of recovery rates of 2-CE

| 编号 | 样品量/ $\mu\text{g}$ | 加入量/ $\mu\text{g}$ | 测得量/ $\mu\text{g}$ | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|----|--------------------|--------------------|--------------------|-------|---------|-------|
| 1  | 0.0                | 16.0               | 16.4               | 102.2 | 98.0    | 4.4   |
| 2  | 0.0                | 16.0               | 16.0               | 99.7  |         |       |
| 3  | 0.0                | 16.0               | 14.7               | 92.1  |         |       |
| 4  | 0.0                | 20.0               | 19.5               | 97.5  | 97.8    | 1.3   |
| 5  | 0.0                | 20.0               | 19.9               | 99.6  |         |       |
| 6  | 0.0                | 20.0               | 19.3               | 96.5  |         |       |
| 7  | 0.0                | 24.0               | 22.4               | 93.5  | 98.5    | 3.7   |
| 8  | 0.0                | 24.0               | 24.0               | 100.0 |         |       |
| 9  | 0.0                | 24.0               | 24.5               | 102.0 |         |       |

### 2.6 样品测定

取明胶空心胶囊样品 1.0 g, 压扁, 精密称定, 置于 20 mL 顶空瓶中, 加入 5 mL 含 30% NaCl 的水溶液, 然后立即压盖密封, 置于顶空炉内, 按照 1.2.1 项下条件进样测定, 计算样品含量。结果表明所有样品均未检出 2-CE, 与现有药典方法检测结果一致。

## 3 结论

本文建立了 GC-ECD 法对明胶空心胶囊中 2-CE 残留量进行测定, 对现有 2-CE 测定法进行优化提高, 建立科学合理的 2-CE 测定方法。优化提高后的 2-CE 测定方法能快速、灵敏测定明胶空心胶囊中 2-CE 的含量, 该研究为 2-CE 的测定标准提高以及明胶空心胶囊的质量控制提供参考。

### 参考文献:

[ 1 ] Gullapalli R P, Mazzitelli C L. Gelatin and non-gelatin capsule dosage forms[J]. *Journal of Pharmaceutic-*

*al Sciences*, 2017, 106 (6): 1453-1465.

- [ 2 ] 庞小刚, 郭捷, 王昊. 双柱气相色谱法测定明胶空心胶囊中环氧乙烷的残留量[J]. *化学分析计量*, 2016, 25(1): 38-40. [PANG Xiaogang, GUO Jie, WANG Hao. Determination of ethylene oxide in gelatin hollow capsules by dual capillary column gas chromatography[J]. *Chemical Analysis and Meterage*, 2016, 25 (1): 38-40.]
- [ 3 ] Wang D D, Zhang A J, Guo W X, et al. Identification of residues in ethylene oxide sterilized hard gelatin capsule shells by gas chromatography-mass spectrometry and development of a simple gas chromatography-flame ionization detector method for the determination of residues[J]. *Journal of Chromatography Open*, 2022, 2 : 100061.
- [ 4 ] Borroto J, Castoldi A F, Chiusolo A, et al. Statement on the BfR opinion regarding the toxicity of 2-chloroethanol[J]. *EFSA Journal*, 2022, 20 (2): e07147.
- [ 5 ] Allemang A, Lester C, Roth T, et al. Assessing the genotoxicity and carcinogenicity of 2-chloroethanol through structure activity relationships and in vitro testing approaches[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2022, 168 : 113290.
- [ 6 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部 2020 年版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 687.
- [ 7 ] Jensen K G. Determination of ethylene oxide residues in processed food products by gas-liquid chromatography after derivatization[J]. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung*, 1988, 187 (6): 535-540.
- [ 8 ] Gilsbach W, Weeren R D. Ringuntersuchungen zur validierung einer gaschromatographischen methode zur bestimmung von rückstnden an ethylenoxid und 2-chlorethanol in gewürzen aus paprika und chili[J]. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 1999.
- [ 9 ] Bessaire T, Stroheker T, Eriksen B, et al. Analysis of ethylene oxide in ice creams manufactured with contaminated carob bean gum (E410)[J]. *Food Additives & Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 2021, 38 (12): 2116-2127.
- [ 10 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部 2020 年版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 796.