

甘磷酸胆碱原料药中3种遗传毒性杂质含量测定方法的建立[△]

张伟奇^{1*},王 倩²,何 燕¹,王雪芹^{2#}(1.河南省食品药品审评查验中心,郑州 450000;2.河南省食品药品检验所,郑州 450008)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)21-2631-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.21.12



摘要 目的:建立气-质联用(GC-MS)法同时测定甘磷酸胆碱原料药中环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇等3种遗传毒性杂质的含量。方法:以4批甘磷酸胆碱原料药为检测样品。色谱柱为ZB-WAXplusTM;进样口温度为200℃;进样方式为不分流进样;载气为氦气(He),恒流模式;程序升温为初始温度30℃保持1 min,然后以30℃/min的速率升温至220℃并保持5 min;进样量为1 μL。离子源为电子轰击源(EI),电离电压为70 eV,离子源温度为200℃;质谱传输接口温度为250℃;质谱监测模式为选择离子(SIM);检测特征离子为环氧氯丙烷[质荷比(m/z)49、57、62]、缩水甘油(m/z 31、43、44)、3-氯-1,2-丙二醇(m/z 44、61、79);溶剂延迟时间为3 min。结果:环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇检测的质量浓度线性范围分别为29.86~746.48、172.91~922.18、21.18~211.85 ng/mL(r 均大于0.999 0);检测限分别为19.91、115.27、10.59 ng/mL;定量限分别为29.86、172.91、21.18 ng/mL;精密度($n=6$)、重复性($n=6$)、稳定性(室温放置12 h, $n=8$)试验的RSD均小于10%;平均加样回收率分别为93.88%、91.45%、91.86%,RSD分别为5.10%、3.10%、2.49%($n=9$)。在4批甘磷酸胆碱原料药中,均未检出上述3种遗传毒性杂质。结论:建立的GC-MS法简单高效、准确度高、重复性好,可用于同时测定甘磷酸胆碱原料药中环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇等3种遗传毒性杂质的含量。

关键词 气-质联用法;甘磷酸胆碱;环氧氯丙烷;缩水甘油;3-氯-1,2-丙二醇

Method Establishment of Content Determination of Three Toxic Impurities in Glycerophosphorylcholine Raw Materials

ZHANG Weiqi¹, WANG Qian², HE Yan¹, WANG Xueqin² (1. Henan Provincial Food and Drug Evaluation and Inspection Center, Zhengzhou 450000, China; 2. Henan Provincial Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish GC-MS method for the content determination of three toxic impurities in glycerophosphorylcholine raw materials, such as epichlorohydrin, glycidyl, 3-chloro-1,2-propanediol. METHODS: Four batches of glycerophosphorylcholine raw materials were used as test samples. The determination was performed on ZB-WAXplusTM column, and the injector temperature was 200℃; the sample injection adopted splitless injection mode, using helium (He) as carrier gas, in constant current mode; the temperature program for the column was initially heating at 30℃ for 1 min, rising to 220℃ at a speed of 30℃/min then remaining 5 min. The ion source was electrospray ion source (EI), the ion source temperature was 200℃, and the ionization energy was 70 eV; transmission interface temperature was 250℃, and mass spectrum monitoring mode was selected ion (SIM). Detection ions were epichlorohydrin [mass charge ratio (m/z) 49, 57, 62], glycidyl (m/z 31, 43, 44), 3-chloro-1,2-propanediol (m/z 44, 61, 79). The solvent delay time was 3 min. RESULTS: The linear range of epichlorohydrin, glycidyl and 3-chloro-1,2-propanediol were 29.86-746.48, 172.91-922.18, 21.18-211.85 ng/mL, respectively (all $r>0.999$ 0). The detection limits were 19.91, 115.27, 10.59 ng/mL, respectively. The limits of quantitation were 29.86, 172.91, 21.18 ng/mL, respectively. RSDs of precision ($n=6$), reproducibility ($n=6$) and stability (placed at room temperature for 12 h, $n=8$) tests were all lower than 10%. The average recoveries were 93.88%, 91.45%, 91.86%, and RSDs were 5.10%, 3.10%, 2.49% ($n=9$), respectively. In the 4 batches of glycerophosphorylcholine raw materials, three toxic impurities were all not detected. CONCLUSIONS: Established GC-MS method is simple, efficient, accurate and repeatable, and it can be used to determine the contents of three toxic impurities in glycerophosphorylcholine raw materials, such as epichlorohydrin, glycidyl, 3-chloro-1,2-propanediol.

KEYWORDS GC-MS method; Glycerophosphorylcholine; Epichlorohydrin; Glycidyl; 3-chloro-1,2-propanediol

[△] 基金项目:河南省市场监督管理局科技计划项目(No.2020sj27)

* 高级工程师。研究方向:药品生产、质量管理以及药品审评、查验。电话:0371-65567062。E-mail:1243053196@qq.com

通信作者:主任药师,硕士。研究方向:食品、药品、化妆品监督检验。电话:0371-65566281。E-mail:244852539@qq.com

甘磷酸胆碱又称甘磷酰胆碱、甘油卵磷脂,是一种人体内天然存在的水溶性磷脂代谢产物,具有提高记忆力、防衰老、降血脂、保肝、健脑等多种功效^[1-2]。3-氯-1,2-丙二醇又称3-氯-1,2-二羟基丙烷,是合成甘磷酸胆碱的起始物料,其可能对人体产生肝肾毒性、免疫毒性、遗

传毒性、生殖毒性,并具有致癌性^[3-5]。环氧氯丙烷、缩水甘油分别为3-氯-1,2-丙二醇合成的起始物料和合成副产物。其中,环氧氯丙烷又称表氯醇、3-氯-1,2-环氧丙烷,因其具有警示结构——环氧结构,故被视为潜在的遗传毒性杂质,具有潜在的致突变性、致畸性和致癌性^[6];缩水甘油又称环氧丙醇,相关动物实验证明其具有致癌作用^[7]。目前,对于环氧氯丙烷、缩水甘油和3-氯-1,2-丙二醇常见的检测方法为气相色谱(GC)法和气-质联用(GC-MS)法^[7-11]。但目前文献报道的方法多是针对食品和环境中的这3种遗传毒性杂质的检测,笔者尚未见甘磷酸胆碱化学原料药中上述3种遗传毒性杂质同时测定的文献报道。由于不同样品的基质和检测要求均有差异,既有文献方法不能满足甘磷酸胆碱原料药中上述3种遗传毒性杂质的检测要求。鉴于此,本研究拟建立GC-MS法同时测定甘磷酸胆碱原料药中环氧氯丙烷、缩水甘油和3-氯-1,2-丙二醇等3种遗传毒性杂质的含量,为该原料药的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Trace DSQ 型 GC-MS 仪(包括 FINNIGAN Trace DSQ 型质谱仪、Thermo FINNIGAN Trace GC ultra 型气相仪、Xcalibur 工作站)购自美国 Thermo Electron 公司; XPE-205 型电子天平购自瑞士 Mettler-Toledo 公司。

1.2 主要药品与试剂

环氧氯丙烷对照品(批号 G154861,纯度 99.9%)、3-氯-1,2-丙二醇对照品(批号 G249657,纯度 95.6%)均购自德国 Dr.Ehrenstorfer 公司;缩水甘油对照品(批号 101344-201501,供 GC 检查用)购自中国食品药品检定研究院;甘磷酸胆碱原料药(批号分别为 191001、200101、200102、200103,纯度均为 99.8%)购自湖南华纳大药厂股份有限公司;甲醇为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 ZB-WAXplus™(30 m×0.25 mm,0.25 μm);进样口温度为 200 ℃;进样方式为不分流进样;载气为氦气(He),恒流模式;程序升温为初始温度 30 ℃保持 1 min,然后以 30 ℃/min 的速率升温至 220 ℃并保持 5 min;进样量为 1 μL。

2.2 质谱条件

离子源为电子轰击源(EI),电离电压为 70 eV,离子源温度为 200 ℃;质谱传输接口温度为 250 ℃;质谱监测模式为选择离子(SIM);检测特征离子为环氧氯丙烷[质荷比(m/z) 49、57、62]、缩水甘油(m/z 31、43、44)、3-氯-1,2-丙二醇(m/z 44、61、79);溶剂延迟时间为 3 min。

2.3 溶液制备

2.3.1 混合对照品溶液的制备 分别取环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇对照品各约 10 mg,精密称定,置于不同 10 mL 量瓶中,分别用甲醇溶解并定容,摇匀,作为各对照品的单一贮备液①。分别精密量取各对照

品的单一贮备液①适量,置于不同量瓶中,用甲醇稀释制成各对照品质量浓度均为 10 μg/mL 的单一贮备液②。分别精密量取各对照品的单一贮备液②适量,置于同一量瓶中,用甲醇稀释制成环氧氯丙烷质量浓度分别为 29.86、199.06、248.83、298.65、398.20、497.65、746.48 ng/mL,缩水甘油质量浓度分别为 172.91、230.54、345.82、461.09、576.36、691.63、922.18 ng/mL,3-氯-1,2-丙二醇质量浓度分别为 21.18、31.78、42.37、52.96、84.74、105.92、211.85 ng/mL 的系列混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称定甘磷酸胆碱原料药 1 g,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,摇匀,经 0.22 μm 滤膜过滤,收集滤液,即得。

2.3.3 空白溶剂 以甲醇为空白溶剂。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 分别精密吸取“2.3”项下环氧氯丙烷质量浓度为 248.83 ng/mL、缩水甘油质量浓度为 345.82 ng/mL、3-氯-1,2-丙二醇质量浓度为 42.37 ng/mL 的混合对照品溶液以及供试品溶液(批号 200101)和空白溶剂,分别按“2.1”“2.2”项下条件进样测定,记录色谱图。结果显示,环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇的保留时间分别为 4.11、5.30、7.73 min,各待测成分峰均分离良好,无干扰峰,表明该方法的专属性较好。专属性的色谱图见图 1。

2.4.2 线性关系考察 精密吸取“2.3.1”项下系列混合对照品溶液各 1 μL,分别按“2.1”“2.2”项下条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分的质量浓度为横坐标(x ,ng/mL)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得到环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇的回归方程分别为 $y=100.19x+265.3$ ($r=0.999\ 7$)、 $y=94.114x-795.22$ ($r=0.999\ 5$)、 $y=46.85x-296.5$ ($r=0.999\ 7$)。结果表明,环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇检测的质量浓度线性范围分别为 29.86~746.48、172.91~922.18、21.18~211.85 ng/mL。

2.4.3 检测限和定量限考察 取混合对照品溶液(环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇的质量浓度分别为 9.95、12.81、10.59 μg/mL,制备方法同“2.3.1”项下),用甲醇逐级稀释,然后按“2.1”“2.2”项下条件进样测定,记录峰面积,以信噪比 3:1、10:1 分别测得检测限和定量限。结果显示,环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇的检测限分别为 19.91、115.27、10.59 ng/mL,定量限分别为 29.86、172.91、21.18 ng/mL。

2.4.4 精密度的试验 取“2.3.1”项下混合对照品溶液(环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇的质量浓度分别为 248.83、345.82、42.37 ng/mL),按“2.1”“2.2”项下条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果显示,环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇峰面积的 RSD 分别为 6.1%、3.3%、5.0% ($n=6$),表明仪器精密度的良好。

2.4.5 稳定性试验 取“2.3.1”项下混合对照品溶液(环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇的质量浓度分别

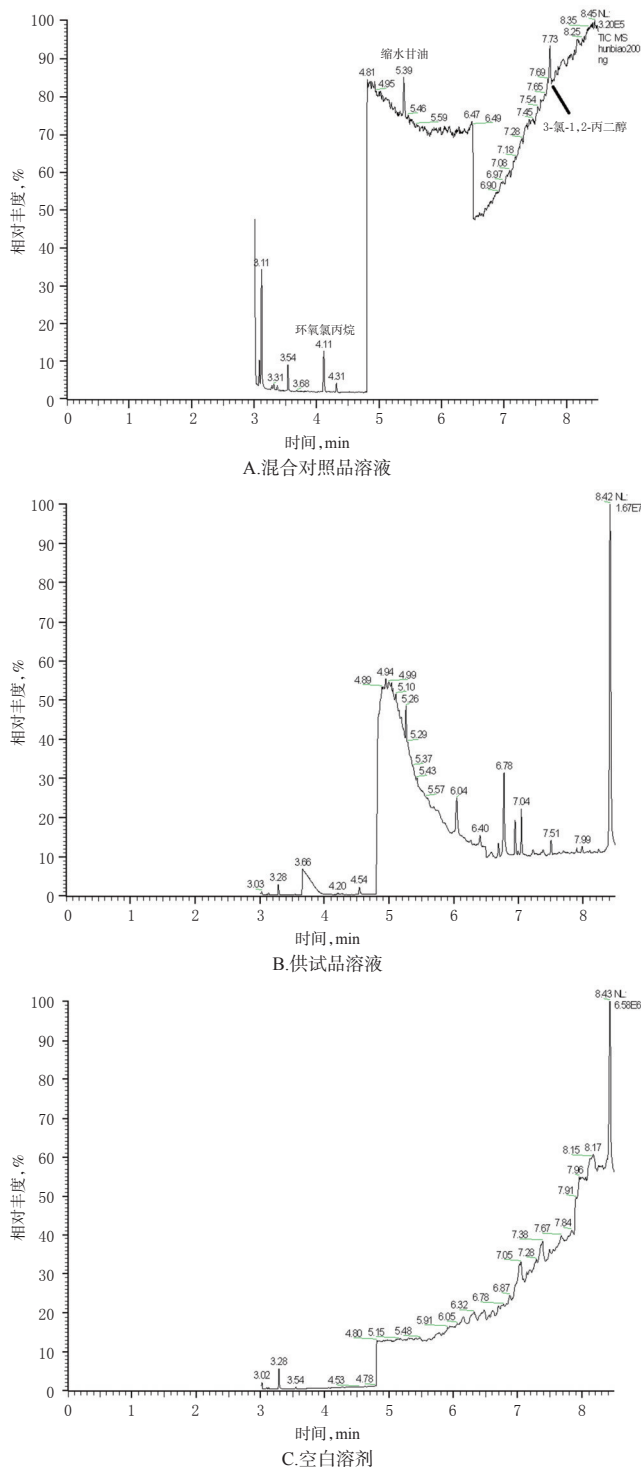


Fig 1 Chromatograms of specificity tests

为248.83、345.82、42.37 ng/mL),于室温下放置0、1、2、4、6、8、10、12 h时,分别按“2.1”“2.2”项下条件进样测定,记录峰面积。结果显示,环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇峰面积的RSD分别为8.2%、3.0%、6.5% ($n=8$),表明该混合对照品溶液在室温下放置12 h内稳定性较好。

2.4.6 重复性试验 取同一批甘磷酸胆碱原料药(批号200101)1 g,精密称定,共6份,分别加入环氧氯丙烷、缩

水甘油、3-氯-1,2-丙二醇对照品单一贮备液②各适量,按“2.3.2”项下方法制备含环氧氯丙烷248.83 ng/mL、缩水甘油345.82 ng/mL、3-氯-1,2-丙二醇42.37 ng/mL的供试品溶液,然后按“2.1”“2.2”项下条件进样测定,记录峰面积,采用外标法计算各杂质的含量并计算其回收率。结果显示,环氧氯丙烷、缩水甘油和3-氯-1,2-丙二醇的回收率分别为90.2%、89.9%、90.9%,RSD分别为7.0%、4.1%、7.1%($n=6$),表明本方法的重复性较好。

2.4.7 加样回收率试验 取同一批甘磷酸胆碱原料药(批号200101)1 g,精密称定,共9份,置于不同10 mL量瓶中,分别加入各对照品的单一贮备液②适量,并以甲醇为溶剂,分别制备低、中、高浓度的样品溶液(低浓度样品溶液中环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇的质量浓度分别为199.06、294.58、33.90 ng/mL,中浓度样品溶液中上述3种成分的质量浓度分别为248.83、358.62、42.37 ng/mL,高浓度样品溶液中上述3种成分的质量浓度分别为298.59、435.47、50.84 ng/mL),每个浓度各3份。分别取上述样品溶液,按“2.1”“2.2”项下条件进样测定,记录峰面积,采用外标法计算各杂质的含量并计算其加样回收率。结果,环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇的平均加样回收率分别为93.88%、91.45%、91.86%,RSD分别为5.10%、3.09%、2.49%($n=9$),表明本方法的准确度较好。加样回收率试验结果见表1。

2.5 甘磷酸胆碱原料药中3种遗传毒性杂质含量的测定

取4批甘磷酸胆碱原料药(批号分别为191001、200101、200102、200103),分别按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,然后按“2.1”“2.2”项下条件进样测定,记录峰面积,并采用外标法计算环氧氯丙烷、缩水甘油和3-氯-1,2-丙二醇的含量。结果,4批甘磷酸胆碱原料药中均未检出上述杂质。

3 讨论

3.1 质谱条件的选择

在前期研究中,笔者先在“full scan”扫描模式下对甘磷酸胆碱原料药溶液和环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇对照品溶液进样后的质谱信息进行采集并通过与NIST质谱数据库进行比对,确定了环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇的出峰时间和特征离子(NIST质谱数据库中无甘磷酸胆碱的相关信息,故未能确定其色谱峰的出峰时间和特征离子):环氧氯丙烷的出峰时间为4.11 min,特征离子 m/z 为49、57、62;缩水甘油的出峰时间为5.39 min,特征离子 m/z 为31、43、44;3-氯-1,2-丙二醇的出峰时间为7.73 min,特征离子 m/z 为44、61、79;溶剂(甲醇)的出峰时间为2.2~2.6 min。然后根据上述结果确定SIM采集模式:从运行3 min起开始检测特征离子 m/z 为49、57、62的质谱信息,从运行4.8 min起开始检测特征离子 m/z 为31、43、44的质谱信息,从运行6.5 min起开始检测特征离子 m/z 为44、61、79的质谱信息,溶剂延迟时间为3 min。接着,笔者以3种

表1 加样回收率试验结果(*n*=9)
Tab 1 Results of recovery tests(*n*=9)

待测成分	样品中含 量,ng	加入量, ng	测得量, ng	加样回收 率,%	平均加样回 收率,%	RSD, %
环氧氯丙烷	-	1 990.61	1 857.97	93.34	93.88	5.10
	-	1 990.61	1 842.33	92.55		
	-	1 990.61	1 789.03	89.87		
	-	2 488.26	2 122.32	85.29		
	-	2 488.26	2 366.79	95.12		
	-	2 488.26	2 471.67	99.33		
	-	2 985.91	2 725.78	91.29		
	-	2 985.91	2 953.70	98.92		
	-	2 985.91	2 961.70	99.19		
缩水甘油	-	2 945.84	2 732.81	92.97	91.45	3.09
	-	2 945.84	2 706.70	91.88		
	-	2 945.84	2 613.11	88.71		
	-	3 586.24	3 434.97	95.78		
	-	3 586.24	3 229.10	90.04		
	-	3 586.24	3 137.42	87.48		
	-	4 354.72	3 910.89	89.81		
	-	4 354.72	4 151.55	95.33		
	-	4 354.72	3 963.52	91.02		
3-氯-1,2-丙二醇	-	338.96	310.00	91.46	91.86	2.49
	-	338.96	297.62	87.80		
	-	338.96	313.62	92.52		
	-	423.70	392.59	92.66		
	-	423.70	382.98	90.39		
	-	423.70	398.14	93.97		
	-	508.44	486.49	95.68		
	-	508.44	468.14	92.07		
	-	508.44	458.32	90.14		

注:“-”表示未检出
Note:“-” means not detected

杂质质量浓度均为 500 ng/mL 的混合对照品溶液进样测定,发现各待测成分色谱峰的响应信号和峰形均较好,证实了上述检测方式的合理性。

3.2 色谱条件的选择

在前期研究中,笔者分别考察了不同型号色谱柱(DB-5MS 色谱柱和 ZB-WAXplus™ 色谱柱)的分离效果。结果显示,采用 DB-5MS 色谱柱和 ZB-WAXplus™ 色谱柱进行分离时,色谱图中均能显示出 3 种待测成分的色谱峰信息;但使用 ZB-WAXplus™ 色谱柱进行分离时,所得色谱图中干扰峰相对较少,而在采用 DB-5MS 色谱柱进行分离时色谱图中缩水甘油的色谱峰出现了明显拖尾现象,故本研究最终选择 ZB-WAXplus™ 色谱柱进行后续研究。采用 GS-MS 法进行含量测定时,为了减少基质及其他组分对质谱检测器的污染,在直接进样方式下的进样量首选为 1 μL,当此进样量不能满足检测要求时再增大进样量^[12]。笔者在前期预实验中发现,当进样量为 1 μL 时,各待测成分的响应强度已满足检测要求,故本研究选择进样量为 1 μL。

3.3 所建方法的合理性分析

按照人用药品注册技术要求国际协调会议(ICH)和 2020 年版《中国药典》(四部)关于遗传毒性杂质控制的相关要求^[12-14],结合甘磷酸胆碱的临床使用情况(最大

日剂量为 1.2 g),可计算得环氧氯丙烷的限度为 2.46 ppm、缩水甘油的限度为 3.56 ppm、3-氯-1,2-丙二醇的限度为 0.4 ppm。而本研究所建方法中上述 3 种杂质的检测限分别为 19.91、115.27、10.59 ng/mL(相当于 0.019 91、0.115 27、0.010 59 ppm),远低于规定的限度。通过对 4 批甘磷酸胆碱原料药进行测定,结果均未检出环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇,表明 4 批原料中 3 种遗传毒性杂质的含量低于检测限,满足限度控制要求。

综上所述,本研究建立的 GC-MS 法简单高效、准确度高、重复性好,可用于同时测定甘磷酸胆碱原料药中环氧氯丙烷、缩水甘油、3-氯-1,2-丙二醇等 3 种遗传毒性杂质的含量。

参考文献

[1] 严希康,钱祥云,丁建飞. L-(-甘油磷脂酰胆碱的研发进展[J].上海医药,2015,36(15):68-72,75.
[2] 卢志花,江磊.甘油磷酰胆碱医药领域专利现状与发展趋势分析[J].中国发明与专利,2018,15(S2):54-58.
[3] 邢寒竹,方冰,常巧英,等.亚慢性暴露 3-氯-1,2-丙二醇对雄性大鼠生殖系统的影响[J].中国食品学报,2019,19(5):39-44.
[4] 白顺,孙建霞,邹飞雁,等.食品污染物 3-氯-1,2-丙二醇毒理作用的研究进展[J].食品工业科技,2013,34(5):358-362.
[5] 曲花玲,刘晓芳. 3-氯-1,2-丙二醇的毒理学研究进展[J].毒理学杂志,2010,24(2):166-169.
[6] 赵丽,段毅宏,张瑞雨,等.吹扫捕集-气相色谱串联质谱测定饮用水中的痕量环氧氯丙烷[J].湖北农业科学,2019,58(21):167-169,172.
[7] 何莲,李怀瑞,朱燮豪,等.测定工作场所空气中缩水甘油的气相色谱法[J].工业卫生与职业病,2017,43(3):225-227.
[8] 孙筱萍,袁雅文.固相萃取-气相色谱质谱法测定水中环氧氯丙烷[J].河南预防医学杂志,2018,29(9):669-670.
[9] 戎伟丰,凌伟洁,黄韬,等.气相色谱法同时测定工作场所空气中 3 种环氧化合物[J].中国职业医学,2014,41(5):573-578.
[10] 薛维丽,由鹏飞,李春焕. GC-MS 测定碳酸司维拉姆中环氧氯丙烷的残留量[J].中国现代应用药学,2019,36(9):1089-1091.
[11] 高洁.调味品中 3-氯-1,2-丙二醇的 GC/MS/MS 法检测[J].中国酿造,2013,32(9):145-147.
[12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2020 年版.北京:中国医药科技出版社,2015:67,527-530.
[13] ICH Expert Working Group. ICH harmonized tripartite guideline: impurities in new drug substances: Q3A(R2)[S]. 2006-06-02.
[14] ICH Expert Working Group. ICH harmonized tripartite guideline: impurities in new drug substances: Q3B(R2)[S]. 2006-10-25.

(收稿日期:2021-05-06 修回日期:2021-09-02)
(编辑:林 静)