

USP43-NF38-6076 분석법에 따른 수크로스 내 총 아황산염(SO_2) 측정

Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계로 시간을 절약하고
오류 원인을 줄일 수 있습니다.



저자

Dr. Wesam Alwan

Dr. Mathieu Rault

Agilent Technologies, Inc.

Melbourne, Victoria, Australia

서론

제약 부형제는 치유적 활동이 아닌 제조 과정을 개선하고 안정성 또는 생체이용률에 도움을 주며 환자 수용성을 향상하기에 제약 제제에 포함되어 있습니다.(1). 수크로스($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)는 제약 산업에서 가장 일반적으로 사용되는 감미료입니다. 수크로스는 경구용 의약품의 좋지 않은 맛을 감추고 방부제 역할을 하며, 액체 의약품의 점도를 높이기 위해 사용됩니다.

제약 제제에 사용되는 수크로스의 안전성과 품질을 보장하기 위해, 불순물을 정확히 측정해야 합니다. 아황산염은 수크로스에서 흔하게 볼 수 있는 불순물입니다. 미국 약전 USP43-NF38-6076(2) 분석법은 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 수크로스 내 총 아황산염 함량을 측정하는 효소 분석법에 대해 설명합니다.

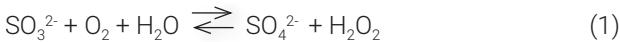
본 연구에서는 USP 분석법에 따른 수크로스 내 총 아황산염 측정에서 Agilent Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계의 이점을 보여줍니다.

실험

백그라운드

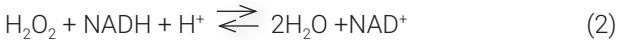
USP43-NF38-6076 분석은 다음과 같은 반응식에서 나타나듯이 산소 존재 하에서 아황산염이 아황산염산화효소에 의해 산화되어 황산염과 과산화수소가 생성된다는 사실을 이용합니다.

(아황산염산화효소)



그런 다음 형성된 과산화수소는 식 2에서와 같이 환원된 nicotinamide-adenine dinucleotide(NADH) 존재 하에서 nicotinamide-adenine-dinucleotide-peroxidase(NADH peroxidase)에 의해 환원됩니다.

(NADH peroxidase)



반응에 의해 형성된 NAD^+ 의 양은 시료 내 아황산염의 양에 비례합니다. NADH 소모량은 340nm에서 흡광도를 측정하여 알아낼 수 있습니다.

총 아황산염 농도는 바탕 용액과 시료의 차이($A_1 - A_2$)를 계산하여 알아낼 수 있습니다. A_1 은 효소 반응이 시작될 때의 흡광도입니다. A_2 는 반응이 끝날 때의 흡광도입니다. $\Delta A_{\text{sulfite}}$ 를 계산하기 위해 시료 흡광도 차이($A_1 - A_2$)에서 바탕 용액의 흡광도 차이($A_1 - A_2$)를 뺍니다.

아황산염 농도 $\text{SO}_2[\text{g/L}]$ 는 다음과 같이 계산할 수 있습니다.

$$C (\text{total SO}_2) = \frac{V \times \text{Mol.Wt}}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A \text{ Sulfite}$$

여기에서,

V = 최종 용량[mL]

Mol.Wt = SO_2 의 분자량[g/mol]

ε = 340nm에서 NADH의 소광 계수= $6300[\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$

d = 투과 경로 길이[cm]

v = 시료량[ml]

실험

시료 제조

시료 1 및 2 용액: 시료 1을 제조하기 위해 2.0g의 수크로스(Sigma Aldrich, CAS 번호 57-50-1)를 종류수 5.0mL에 최종 농도 400mg/mL가 되도록 녹여줍니다. 이러한 절차를 시료 2에서 반복했으며, 이 경우 2.0g의 상업용 수크로스(지역 슈퍼마켓에서 구매)를 사용했습니다.

아황산염 표준 용액(80ppm SO_2): 157.5mg의 건조

아황산나트륨을 1.0L 종류수에 최종 농도 0.1575mg/mL가 되도록 녹여줍니다.

참조 용액: 4.0g의 수크로스(Sigma Aldrich, CAS 번호 57-50-1)를 종류수 5.0mL에 녹여줍니다. 그런 다음 상기 아황산염 표준 용액 0.5mL를 침가하고 최종 용액인 종류수를 사용하여 10.0mL로 희석했습니다.

표준 용액: 1.0L 부피 플라스크에 1.0g의 구연산을 첨가하고 1.0L 종류수로 녹여줍니다. 그 후 800mg의 건조 아황산나트륨(Merck, CAS 번호 7757-83-7)을 정확히 칭량하여 용액에 첨가합니다(최종 농도 ~400mg/L SO_2). 여러 개의 아황산염 표준 용액(0~400mg/L, 표 1)은 원액을 적절한 용량인 1g/L 구연산 용액으로 희석하여 제조했습니다.

표 1. 표준 용액 농도.

표준 용액 번호	농도(mg/L)
표준 용액1	0
표준 용액2	67
표준 용액3	135
표준 용액4	203
표준 용액5	270
표준 용액6	338
표준 용액7	407

효소 키트: 총 아황산염(SO_2) 효소 키트, 표 2(Megazyme, 제품 코드: K-ETSULPH).

표 2. Megazyme 효소 키트 구성품.

병 번호.	성분
1	완충액
2	NADH
3	NADH peroxidase 혼탁액
4	아황산염산화효소 혼탁액

큐벳: 본 실험에서는 표준 석영 큐벳(용량 3.5mL, 광학 경로 길이 10mm)을 사용하였으며 별 모양 자력 교반기로 교반했습니다.

기기 및 분석법

모든 측정에는 Agilent Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광 광도계를 사용했습니다(그림 1). 분석법 파라미터는 표 3에 나와 있습니다.



그림 1. Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광 광도계.

표 3. 기기 파라미터. NADH 소모량을 모니터링하기 위해 단일 파장에서의 흡광도를 시간(파라미터 1)에 따라 측정했습니다. 반응 전후의 NADH 소모량을 측정하기 위해 파장 범위(파라미터 2)에 따라 용액의 흡광도를 반복적으로 측정했습니다. 효소 키트와 함께 제공되는 지침은 베이스라인 측정에 공기를 사용할 것을 권장합니다.

파라미터	파라미터 1	파라미터 2
파장(nm)	340	300~400
신호 평균 시간(s)	5	0.2
데이터 간격	해당 없음	1
스펙트럼 대역폭(nm)	2	2
교반 속도(rpm)	500	500
베이스라인	공기	공기
시간(분)	45	4
속력(nm/min)	해당 없음	300
스캔 간 시간 간격(s)	해당 없음	0

각 큐벳은 표 4에 나타낸 바와 같이 피펫을 사용하여 총 3.340mL의 용량으로 채웠습니다. 캠핑 전 각각의 큐벳 안에 별 모양 교반기를 배치합니다. 시료는 Cary 3500의 교반 기능을 사용하여 500rpm에서 혼합했습니다. 용액(A1)의 흡광도는 약 4분간 교반 후 측정했습니다. 그 후 아황산염산화효소를 첨가하여 반응을 시작했습니다. 용액(A2)의 흡광도는 45분 후 반응이 끝날 때 측정했습니다. Cary 3500은 소프트웨어로 제어된 큐벳 내 교반 기능으로 시료 균질성을 보장하는 이 작업에 적합합니다. 이 기능은 큐벳을 인버팅함으로써 시료 손실과 오염을 유발할 수 있는 스파츌라 또는 혼합법을 통한 혼합을 대체합니다.

표 4. 각 용량의 시약 용액과 종류수를 각 큐벳에 첨가하여 시료, 참조 샘플 및 표준 용액을 제조합니다.

용액	바탕 용액	시료	참조 용액	표준 용액 (0~407ppm)
종류수	2.60mL	0.6mL	0.6mL	2.50mL
측정 용액	-	2.0mL	2.0mL	0.10mL
완충액	0.50mL	0.50mL	0.50mL	0.50mL
NADH	0.20mL	0.20mL	0.20mL	0.20mL
NADH peroxidase	0.02mL	0.02mL	0.02mL	0.02mL
아황산염산화효소	0.02mL	0.02mL	0.02mL	0.02mL

7가지 표준 용액의 농도는 표 1과 같습니다. 이 결과는 기기와 함께 제공되는 Cary UV Workstation 소프트웨어와 Agilent OpenLab 소프트웨어 옵션을 사용하여 측정되었습니다. OpenLab은 21 CFR Part 11 및 Annex 11 데이터 무결성 요구 사항을 준수하도록 도와주는 도구를 제공합니다. 이러한 도구에는 검색 가능한 모든 변경 사항의 감사 추적이 포함됩니다.

결과 및 토의

USP 분석법에 따른 수크로스 시료 내 총 아황산염 정량 분석

USP43-NF38 모노그래프에 따라 수크로스의 총 아황산염 함량 (SO_2)을 측정하기 위해 약 340nm에서 발생하는 최대 흡광도를 반응의 시작(A_1) 및 종료(A_2)에서 기록해야 합니다. 그런 다음 바탕 용액으로 얻은 값에서 이 값을 뺍니다. 시료 용액의 흡광도 차이 ($A_1 - A_2$)는 참조 용액의 흡광도 값의 절반 이하이어야 합니다.

Agilent Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 측정한 수크로스 시료 내 $\Delta A_{\text{sulfite}}$ 는 시료 1과 2의 경우 각각 0.0023Abs, 0.0044Abs였습니다(표 5). 두 시료의 $\Delta A_{\text{sulfite}}$ 는 참조 용액의 절반 이하였으며, USP에서 규정한 허용 범위 이내였습니다. 이러한 결과는 Cary 3500이 수크로스 내 아황산염 불순물 측정에 적합함을 암시합니다.

표 5. 수크로스 시료 내 총 아황산염(SO_2) 측정.

항목	A_1	A_2	$A_1 - A_2$	$\Delta A_{\text{sulfite}}$	총 아황산염 (g/L)	총 아황산염 (ppm)
시료 1	1.8805	1.6444	0.2360	0.0069	0.0023	2.3671
시료 2	1.8951	1.6529	0.2422	0.0131	0.0044	4.4722
참조 용액	1.8957	1.4572	0.4385	0.2094	0.0711	71.125

표준 용액 내 총 아황산염 정량 분석

Cary 3500 Multicell UV-Vis 기기는 8개의 큐벳 위치(시료 7개 및 참조 샘플 1개)를 동시에 측정할 수 있습니다. 반응 시작 전, 반응 도중, 반응 후 300~400nm의 파장 스캔을 12회 수행하여 동일한 조건에서 같은 시간에 7가지의 표준 용액을 동시에 모니터링했습니다(그림 2). 여러 개의 시료/표준 용액을 동시에 측정하는 기능은 환경과 작업자에 기인한 분석 변수와 이로 인한 데이터 정확성 저하의 위험을 제거해줍니다. Cary UV Workstation Kinetic 애플리케이션은 분석자가 스캔하는 파장 또는 파장 범위의 별개의 숫자 중 하나를 선택할 수 있도록 해줍니다.

7가지의 표준 용액의 흡광도(A_i)는 Cary UV Workstation Kinetics 애플리케이션을 사용하여 동시에 측정되었습니다. 측정은 4분 (12회 스캔) 동안 300~400nm의 흡광도를 측정하여 수행했습니다. 그런 다음, 피펫을 사용하여 아황산염산화효소 혼탁액 $20\mu\text{L}$ 를 차례대로 각 표준 용액에 첨가하여 혼합했습니다. NADH 소모량은 Kinetic 애플리케이션을 사용하여 45분 동안 흡광도를 감소시킴으로써 340nm에서 모니터링했습니다. 표준 용액(A_i)의 흡광도는 흡광도 (A_i)를 측정하는 표 3(파라미터 2)의 동일한 파라미터를 사용하여 반응이 끝나는 시점에 측정했습니다. 총 아황산염(SO_2)은 MS Excel로 내보낸 데이터를 사용하여 식 3에 설명된 대로 계산했습니다. 그 결과는 표 6에 요약되어 있습니다.

표 6. 각 표준 용액의 계산된 총 아황산염(SO_4^{2-}) 농도.

표준 용액	A_1	A_2	A_1-A_2	$\Delta A_{\text{sulfite}}$	총 아황산염[g/L]	총 아황산염[ppm]	제조된 총 아황산염[ppm]
1	1.7916	1.5963	0.1952	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000
2	1.8303	1.4371	0.3932	0.1979	0.0672	67.2190	67.5254
3	1.8364	1.2289	0.6075	0.4123	0.1400	140.0200	135.4576
4	1.8419	1.0260	0.8159	0.6206	0.2107	210.7690	203.3898
5	1.8011	0.7785	1.0226	0.8273	0.2809	280.9740	270.9152
6	1.8554	0.6322	1.2232	1.0279	0.3490	349.0930	338.8474
7	1.9025	0.5076	1.3949	1.1996	0.4073	407.3990	406.7796

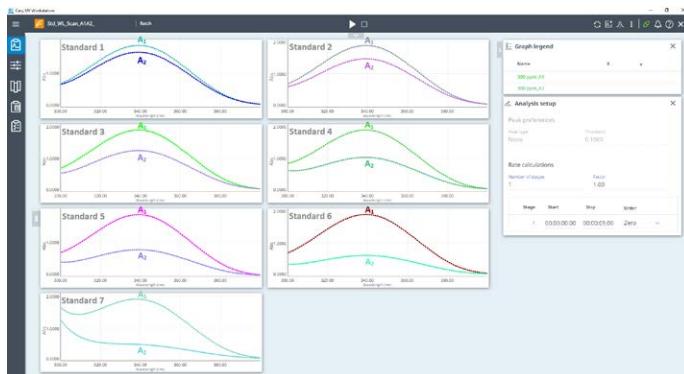


그림 2. Cary 3500 Multicell UV-Vis 기기와 결합된 Cary UV Workstation Kinetics 애플리케이션은 7가지 표준 용액을 동시에 측정할 수 있습니다. 그림은 반응이 시작될 때(A_1 로 표시)와 반응이 종료된 후(A_2 로 표시) 각각의 7가지의 표준 용액에 대한 중첩 파장 스캔(300~400nm)을 나타냅니다.

시간에 따른 NADH 소모량 모니터링

아황산염산화효소 첨가 후 NADH의 소모량을 모니터링하기 위해 Cary UV Workstation Kinetics 애플리케이션을 사용했습니다. 7가지의 모든 표준 용액을 동시에 측정하였으며 기기는 각 표준 용액의 340nm에서 45분 동안의 흡광도를 모니터링했습니다 (그림 3). 이러한 접근법은 5시간 이상이 소요되는 각 표준 용액의 개별 측정에 비해 시간을 상당히 절약할 수 있습니다. Cary 3500은 구동 부위가 없기 때문에 데이터 수집 속도가 매우 빠르며(최대 250개의 초당 데이터 지점) 광도 측정 범위가 넓습니다. 이러한 기능을 통해 모든 측정 유형에서 정확한 데이터를 수집할 수 있습니다.



그림 3. Cary 3500 UV-Vis 시스템을 사용하여 동시에 측정, 7가지 표준 용액의 시간에 따른 흡광도 측정.

결론

Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광 광도계는 한 번의 실험에서 동시에 모니터링되는 7가지 표준 용액의 NADH 소모량을 모니터링할 수 있습니다. 이러한 접근법은 각 표준 용액의 개별 측정에 비해 5시간 이상의 측정 시간을 절약했습니다. 또한 동시 측정은 주변 온도 변화와 같은 측정 변수를 제거하여 7가지 표준 용액이 모두 동일한 조건에서 측정되었음을 의미합니다.

USP43-NF38 분석법에 따라 수크로스의 총 아황산염 함량을 측정했습니다. 다수의 시료를 동시에 측정함으로써 가능한 환경, 작업자 및 기기로 인한 오류를 줄이고 데이터 품질을 향상했습니다. Agilent OpenLab 소프트웨어 옵션은 데이터 수집 프로세스에 대한 Part 11/Annex 11 규제 준수를 지원하기 위해 사용되었습니다.

Cary 3500의 소프트웨어 제어 교반 기능은 측정 시간에 걸쳐 큐벳 내의 모든 반응물을 혼합했습니다.

참고 문헌

1. Lucie Nováková et al., Pharmaceutical Analysis | Overview, Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition), Academic Press, 2019, Pages 200-218, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14504-4>.
2. United States Pharmacopeia, USP43-NF38-6076.

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

DE44467.2379976852

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 10월 12일, 한국에서 인쇄
5994-3930KO

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

