

根据 USP43-NF38-6076 方法测定蔗糖中的总亚硫酸盐 (SO₂)

Cary 3500 紫外-可见分光光度计可节省时间并减少误差来源。



作者

Wesam Alwan 博士

Mathieu Rault 博士

安捷伦科技有限公司

澳大利亚维多利亚州墨尔本

前言

药物制剂中添加药物赋形剂不是因为其具有治疗活性，而是为了优化生产过程，帮助提高制剂稳定性或生物利用度，并提高患者的可接受性^[1]。蔗糖 (C₁₂H₂₂O₁₁) 是制药行业中最常用的甜味剂，常用于掩盖口服药物令人不快的味道，充当防腐剂，以及提高液体药物的粘度。

为确保药物制剂中使用的蔗糖的安全性和质量，需要对杂质进行准确测定。亚硫酸盐是蔗糖中常见的杂质。美国药典方法 USP43-NF38-6076^[2] 介绍了一种使用紫外-可见分光光度法测定蔗糖中总亚硫酸盐含量的酶解方法。

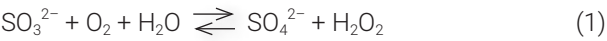
在本研究中，我们将展示 Agilent Cary 3500 紫外-可见分光光度计在根据 USP 方法测定蔗糖中总亚硫酸盐方面的优势。

实验部分

背景

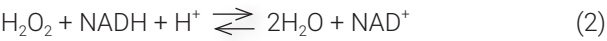
USP43-NF38-6076 方法的原理是，在有氧条件下，亚硫酸盐被亚硫酸盐氧化酶氧化，生成硫酸盐和过氧化氢，如下面的反应方程式所示。

(亚硫酸盐氧化酶)



然后，在还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 的存在下，生成的过氧化氢被烟酰胺腺嘌呤二核苷酸过氧化物酶 (NADH 过氧化物酶) 还原，如下面的方程式 2 所示。

(NADH 过氧化物酶)



反应中生成的 NAD+ 的量与样品中亚硫酸盐的含量成正比。通过测量 340 nm 处的吸光度可以确定 NADH 的消耗量。

通过计算空白和样品反应前后的吸光度差值 (A1-A2) 可以确定总亚硫酸盐浓度。A1 为酶解反应开始时的吸光度。A2 为酶解反应结束时的吸光度。为了获得 ΔA_{亚硫酸盐}，用样品的吸光度差 (A1-A2) 减去空白的吸光度差 (A1-A2)。

根据下面的公式，可以计算亚硫酸盐浓度（以 SO2 计）[g/L]：

C(总 so2) = (V x Mol.Wt) / (ε x d x v) x ΔA_{亚硫酸盐} (3)

其中：

V = 最终体积 [mL]

Mol.Wt = SO2 的分子量 [g/mol]

ε = NADH 在 340 nm 处的消光系数 = 6300 [l x mol⁻¹ x cm⁻¹]

d = 光程 [cm]

v = 样品体积 [mL]

实验部分

样品前处理

样品 1 和样品 2 溶液：将 2.0 g 蔗糖（Sigma Aldrich，CAS 号 57-50-1）溶于 5.0 mL 蒸馏水中，得到最终浓度为 400 mg/mL 的样品 1。使用 2.0 g 市售蔗糖（购自当地超市），重复上述流程制备得到样品 2。

亚硫酸盐标准溶液 (80 ppm SO2)：将 157.5 mg 无水亚硫酸钠溶于 1.0 L 蒸馏水中，得到最终浓度 0.1575 mg/mL。

参比溶液：将 4.0 g 蔗糖（Sigma Aldrich，CAS 号 57-50-1）溶于 5.0 mL 蒸馏水中。加入 0.5 mL 上述亚硫酸盐标准溶液，然后用蒸馏水将所得溶液稀释至 10.0 mL。

标准溶液：将 1.0 g 柠檬酸加入 1.0 L 容量瓶中，并用 1.0 L 蒸馏水溶解。然后，准确称取 800 mg 无水亚硫酸钠（Merck，CAS 号 7757-83-7）并加入溶液中（最终浓度约 400 mg/L，以 SO2 计）。用适量的 1 g/L 柠檬酸溶液稀释储备液，配制多个浓度的亚硫酸盐标准溶液（0-400 mg/L，表 1）。

表 1. 标准溶液浓度

标样编号	浓度 (mg/L)
标样 1	0
标样 2	67
标样 3	135
标样 4	203
标样 5	270
标样 6	338
标样 7	407

酶解试剂盒：总亚硫酸盐 (SO2) 酶解试剂盒，表 2 (Megazyme，产品编码：K-ETSULPH)。

表 2. Megazyme 酶解试剂盒内容物

瓶号	成分
1	缓冲液
2	NADH
3	NADH 过氧化物酶悬液
4	亚硫酸盐氧化酶悬液

样品池：本实验采用 3.5 mL 10 mm 光程的标准石英样品池以及星型磁力搅拌子。

仪器和方法

所有测量均使用 Agilent Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计 (图 1)。方法参数见表 3。



图 1. Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计

表 3. 仪器参数。为了监测 NADH 的消耗情况，在单波长处测量吸光度随时间的变化 (参数 1)。为了测量反应前后 NADH 的消耗，在特定波长范围内重复测量了溶液的吸光度 (参数 2)。酶解试剂盒随附的说明书建议使用空气确定基线值

参数	参数 1	参数 2
波长 (nm)	340	300–400
信号采集平均时间 (s)	5	0.2
数据间隔	不适用	1
光谱带宽 (nm)	2	2
搅拌速度 (rpm)	500	500
基线	空气	空气
时间 (min)	45	4
速率 (nm/min)	不适用	300
扫描时间间隔 (s)	不适用	0

如表 4 中所示，使用移液器向每个样品池中加入总体积为 3.340 mL 的溶液。加盖前向每个样品池中放入一个星型搅拌子。使用 Cary 3500 的搅拌功能，以 500 rpm 的转速混合样品。在搅拌约 4 分钟后测量溶液的吸光度 (A1)。然后加入亚硫酸盐氧化酶开始反应。45 分钟后，在反应结束时测量溶液的吸光度 (A2)。Cary 3500 能够通过软件来控制样品池中的搅拌，确保样品的均匀性，非常适合这项工作。这一功能取代了用刮刀混合或通过倒置样品池进行混合，这些操作可能导致样品损失和污染。

表 4. 配制样品、参比和标样时，每个样品池中加入的各种试剂溶液和蒸馏水的体积

溶液	空白	样品	参比	标样 (0–407 ppm)
蒸馏水	2.60 mL	0.6 mL	0.6 mL	2.50 mL
待测溶液	-	2.0 mL	2.0 mL	0.10 mL
缓冲液	0.50 mL	0.50 mL	0.50 mL	0.50 mL
NADH	0.20 mL	0.20 mL	0.20 mL	0.20 mL
NADH 过氧化物酶	0.02 mL	0.02 mL	0.02 mL	0.02 mL
亚硫酸盐氧化酶	0.02 mL	0.02 mL	0.02 mL	0.02 mL

7 个标样各自的浓度如表 1 所示。使用可选的 Agilent OpenLab 软件和仪器随附的 Cary 紫外工作站软件进行检测。OpenLab 提供了有助于满足 21 CFR Part 11 和附录 11 数据可靠性要求的工具。这些工具包括针对每次更改的可供检索的审计追踪。

结果与讨论

根据 USP 方法定量分析蔗糖样品中的总亚硫酸盐

为了根据 USP43-NF38 专论方法测定蔗糖中的总亚硫酸盐含量 (SO₂)，应在反应开始 (A₁) 和结束 (A₂) 时记录约 340 nm 处出现的最大吸光度。然后从这些值中扣除空白溶液获得的相应值。样品溶液的吸光度差 (A₁-A₂) 不应超过参比溶液吸光度差的一半。

使用 Agilent Cary 3500 紫外-可见分光光度计测得的蔗糖样品 1 和样品 2 的 ΔA_{亚硫酸盐} 分别为 0.0023 Abs 和 0.0044 Abs (表 5)。两个样品的 ΔA_{亚硫酸盐} 均小于参比的一半，并且在 USP 规定的可接受范围内。结果表明，Cary 3500 适用于蔗糖中亚硫酸盐杂质的测定。

标准溶液中总亚硫酸盐的定量分析

Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计可同步测量 8 个样品池位置 (7 个样品和 1 个参比)。通过在反应开始前、反应过程中和反应结束后，在 300–400 nm 波长范围内进行 12 次扫描，在相同条件下同时监测 7 个标样 (图 2)。同时测量多个样品/标样的功能消除了环境和操作人员造成的分析误差以及由此带来的数据准确性风险。Cary 紫外工作站动力学应用程序使分析人员可以选择不连续的波长或特定波长范围进行扫描。

使用 Cary 紫外工作站动力学应用程序同时测量 7 个标样各自的吸光度 (A_i)。其方式为测量 300–400 nm 范围内的吸光度 4 分钟 (12 次扫描)。然后，使用移液器将 20 μL 亚硫酸盐氧化酶悬液依次加入每个标样中并混合。使用动力学应用程序，通过 45 分钟内 340 nm 处降低的吸光度来监测 NADH 的消耗。在反应结束时，使用表 3 中用于测量吸光度 (A₁) 的相同参数 (参数 2) 测量标准溶液的吸光度 (A₂)。使用导出到 MS Excel 的数据，按照公式 3 计算总亚硫酸盐 (SO₂)。结果汇总于表 6 中。

表 5. 蔗糖样品中总亚硫酸盐 (SO₂) 的测定

溶液	A ₁	A ₂	A ₁ -A ₂	ΔA _{亚硫酸盐}	总亚硫酸盐 (g/L)	总亚硫酸盐 (ppm)
样品 1	1.8805	1.6444	0.2360	0.0069	0.0023	2.3671
样品 2	1.8951	1.6529	0.2422	0.0131	0.0044	4.4722
参比	1.8957	1.4572	0.4385	0.2094	0.0711	71.125

表 6. 计算得到的每种标准溶液的总亚硫酸盐 (SO₂) 浓度

标准溶液	A ₁	A ₂	A ₁ -A ₂	ΔA 亚硫酸盐	总亚硫酸盐 [g/L]	总亚硫酸盐 [ppm]	总亚硫酸盐制备浓度 [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

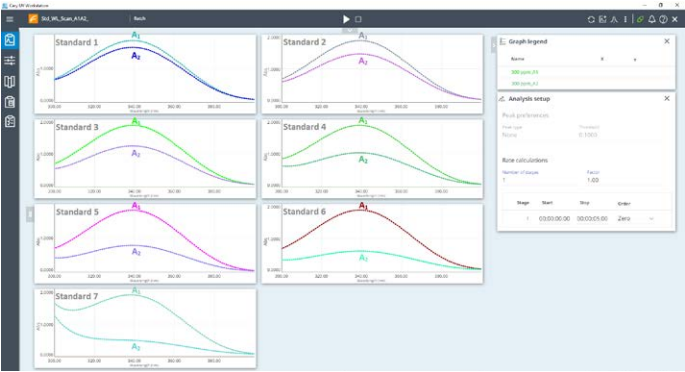


图 2. Cary 紫外工作站动力学应用程序，与 Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计配合使用时，可同步测量 7 个标样。此处所示为反应开始时（标记为 A₁）和反应完成后（标记为 A₂）7 个标样各自的波长扫描 (300–400 nm) 结果叠加图

监测 NADH 随时间的消耗情况

Cary 紫外工作站动力学应用程序用于监测添加亚硫酸盐氧化酶后 NADH 的消耗情况。仪器同时测量 7 个标样，监测 45 分钟内每个标样在 340 nm 处的吸光度（图 3）。与每个标样单独测量，总测量时间需要 5 多个小时相比，这种方法可节省大量的时间。Cary 3500 具有高数据采集速率（多达 250 个数据点/秒）和宽光度测量范围，不含活动部件。这些功能可确保在所有测量类型下均可采集准确的数据。



图 3. 使用 Cary 3500 紫外-可见分光光度计系统同时测量 7 个标准溶液得到的基于时间的吸光度测量值

结论

Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计能够在单次实验中同步监测 7 个标样中 NADH 的消耗情况。与单独测量每个标样相比，这种方法可节省 5 个多小时的测量时间。同步测量还意味着 7 个标样均在相同的条件下进行检测，从而消除了任何测量变量（例如环境温度的变化）。

根据 USP43-NF38 方法测定了蔗糖中的总亚硫酸盐含量。同步测量多个样品能够尽可能减少环境、操作人员和仪器引入的误差，提高数据质量。可选的 Agilent OpenLab 软件用于支持数据采集过程的 Part 11/附录 11 合规性。

Cary 3500 可通过软件控制的搅拌功能在整个测量期间混合样品池中的所有反应物。

参考文献

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.

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

DE44467.2379976852

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。