

提高数据可靠性并消除 UV-Vis 测量中的分析变量

Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计同步测量标准曲线和多个样品



作者

Matthew Quinn 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

制药环境中常见的质量保证/质量控制 (QA/QC) 过程需要在生产期间和生产后对治疗性活性化合物和赋形剂进行常规监测。对此，一种成熟的方法是利用紫外-可见分光光度法通过校准曲线测定浓度。尽管这种方法较为可靠，但也可能引入一些会影响数据质量的变异。这类型的变量最有可能来自仪器、环境误差或操作人员误差。

乙酰水杨酸 (ASA) 是阿司匹林中的活性成分，阿司匹林是一种常见的抗风湿、抗炎和镇痛药^[1]。我们利用该化合物来展示 Cary 3500 紫外-可见分光光度计所独有的一种分析方法。与许多常见药物一样，除活性药物成分 (API) 外，片剂还包含大量的粘合剂、着色剂、增溶剂等非活性成分。

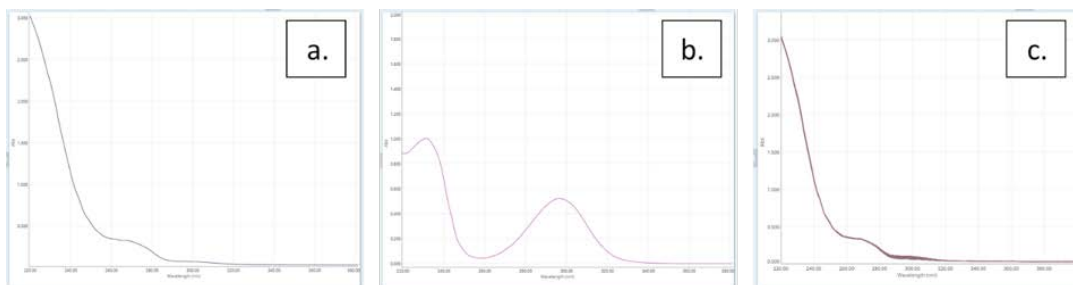


图 1. (a.) ASA 和 (b.) SA 的吸收光谱，以及 (c.) 25 °C 下 4 小时后 ASA 样品的吸收信号，表明正在发生水解反应

通过将 ASA 水解成去乙酰化形式的水杨酸 (SA)，可轻松测定 ASA 的百分比组成。此时只需通过测量紫外-可见吸光度并结合校准曲线便可定量 SA。

环境误差可能来源于多方面，温度的极小变化或与水接触都可能导致吸光度信号发生明显变化。ASA 与水接触时非常不稳定，即使在室温下也会水解成 SA (图 1)，导致吸光度曲线发生巨大变化。

这种不稳定性意味着使用传统的紫外-可见分光光度计时，必须在特定 pH 条件和特定温度下非常快速地完成分析。或者，在测定浓度之前将 ASA 转变为 SA。此方法是假设样品中原本不存在游离 SA，而之前的研究已经证明这不太符合实际^[2]。如图 2 所示，温度升高可能是导致水解的重要因素。这表明，对于此样品而言，应重点考虑最大程度降低潜在的环境误差。

许多实验设计中包括执行重复分析，以避免操作人员误差。其他误差来源包括样品前处理中的预期和非预期偏差，或者样品测量之间的偶发性事故导致的测量误差。Cary 3500 多池系统

可同步测量八个样品池位置。在完全相同的条件下，同时分析总共七个标样和样品（以及一个参比）。Cary 3500 多池系统通过同步测量样品、标样和对照，提供了一种实现数据可靠性的新方法。此功能消除了环境和操作人员造成的分析变量以及由此带来的数据准确性风险。

Cary 3500 还具有其他一些关键功能，能够最大程度减少由仪器引入的变异。这款仪器没有需要校准的活动部件，可防止样品架位置校准不正确导致的误差。此外，还可以同时测量样品和标样。此功能可防止由于仪器性能和校准随时间变化而导致的误差。通过这种方式，Cary 3500 能够最大程度减少因仪器误差而引入的变异。

本应用简报测定了市售阿司匹林样品的百分比组成。首先进行碱水解，然后测量 296 nm 处的吸光度。同步测量六个标样和一个样品能够最大程度减少环境、操作人员和仪器引入的误差。

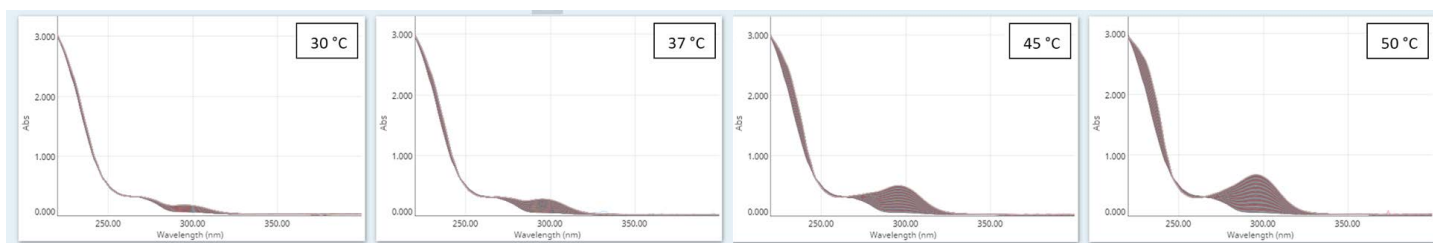


图 2. 在 30、37、45 和 50 °C 下，4 小时内 ASA 转化为 SA 的情况，表明随温度升高反应速率增大

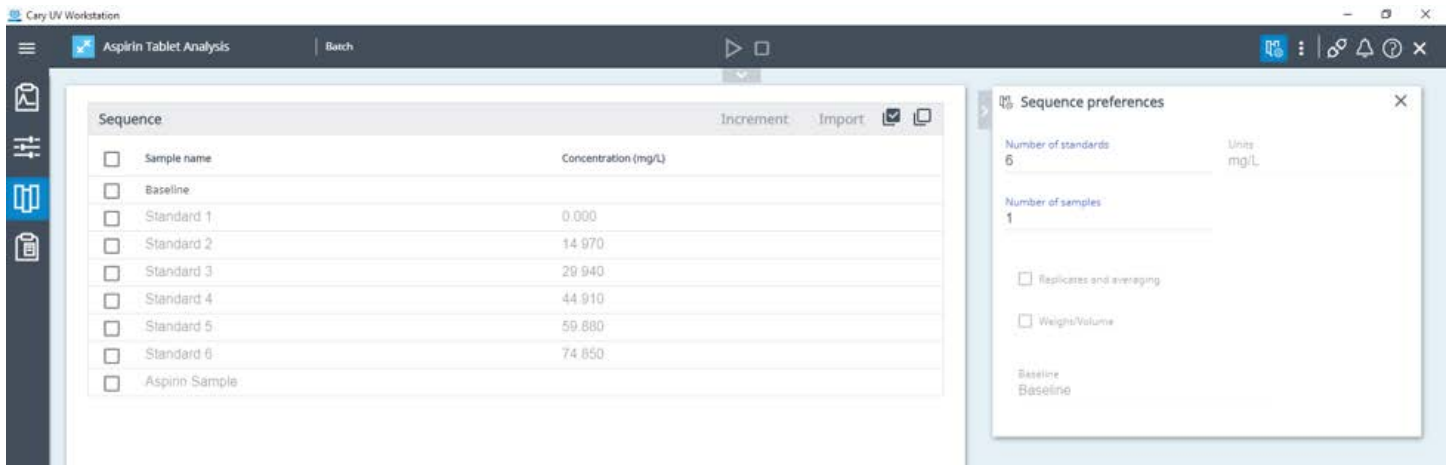


图 3. Cary UV 工作站浓度应用程序中的序列页面，其中显示了基线选择、标样和样品数量，以及单位选择和标样浓度

实验部分

标样溶液前处理

将 0.2 g 纯 SA 溶解在磷酸盐缓冲溶液（PBS；用 Milli-Q 过滤水配制，pH 为 7.5）中，用以配制 SA 标准曲线样品。表 1 为配制的标准曲线样品，吸光度范围约为 0–2 个吸光度单位。

表 1. 配制的标样浓度

标样 ID	浓度 (mg/L)
标样 1	0
标样 2	14.97
标样 3	29.94
标样 4	44.91
标样 5	59.88
标样 6	74.85

市售阿司匹林片剂的碱水解

购买市售阿司匹林片剂样品。该片剂重 163.7 mg。将其溶于 75 °C 的 Milli-Q 过滤水中，用 1 mol/L 氢氧化钠将 pH 调节至约 12。将样品在上述条件下保持 1 小时，使 ASA 酸完全水解成 SA。

将样品定容至 1 L，然后稀释至校准范围内，并调节至 pH 7.5。

仪器

Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计能够同时测量 8 个样品池，因此选择其用于此项研究。此功能可确保在相同条件下测量每个样品池。

表 2. 仪器参数

参数	设置
波长范围 (nm)	400–250
光谱带宽 (nm)	2
信号采集平均时间 (s)	0.4
数据间隔 (nm)	1
切片波长 (nm)	296
温区配置	1 个温区

为了进行扫描，将每种标样和样品以及 Milli-Q 水参比样品取 2.5 mL 转移至 3.5 mL 石英样品池中。使用 Cary UV 工作站软件中的浓度应用程序，选择单个温区，允许所有七个位置使用单个参比进行同步测量。所用参数如表 2 中所列。

输入所配制标样的浓度，并选择应用基线（图 3）。总共六个标样用于绘制校准曲线，此外还有一个阿司匹林片剂样品。

采集每个样品池位置的基线。然后在一次同步测量中测量标样和样品。

结果与讨论

同步分析标准曲线和片剂样品

波长扫描范围为 400 nm 到 250 nm，可实现 SA 峰的定性和定量分析。得到峰最大值位于 296 nm。使用 Cary 3500 多池系统同步分析所有标样和样品。这意味着所有标样和样品都是同时测量，因此测量条件完全相同。

在六个标样和样品的波长扫描结束之后，测定每个标样和样品在 296 nm 处的吸光度读数。根据得到的数据，创建标准曲线，计算片剂样品浓度。阿司匹林片剂样品中 SA 浓度测定值为 7.755 mg/L（考虑进稀释倍数时为 77.55 mg/L）。该浓度相当于片剂中 ASA 含量为 101.15 mg（图 4）。

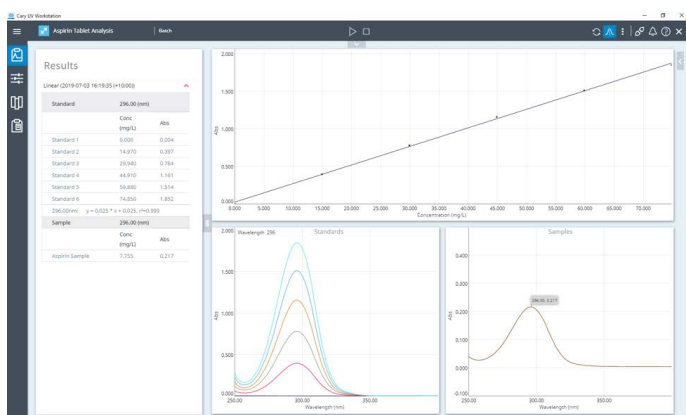


图 4. Cary UV 工作站软件，展示了 SA 标准曲线（上中）以及相关的标样（下中）和片剂样品（右下）扫描谱图。在左侧可以看到线性方程和相关系数，以及 296 nm 处的原始值

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

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

根据测定的样品片剂质量，可计算百分比组成。整个低剂量阿司匹林片剂的质量为 163.7 mg，其中 ASA 质量的测定值为 101.15 mg，占片剂的 61.70%。

结论

购买了市售阿司匹林片剂并将其进行碱水解反应。测定所得到的溶液中的 SA 浓度，从而测定 ASA 浓度。建立 SA 标准曲线，同步分析所有标样和样品。此方法消除了因环境、仪器或操作人员误差而影响结果的风险。片剂中 ASA 的质量测定值为 101.15 mg，占片剂的 61.70%。

Cary 3500 多池系统通过同步测量样品、标样和对照，提供了一种实现数据可靠性的新方法。此功能消除了环境和操作人员造成的分析变量以及由此带来的数据准确性风险。

参考文献

1. Erkan D, Harrison MJ., Levy R., Peterson M., Petri M., Sammiriatno L., Unalp-Arida A., Vilela Y., Yazici Y., Lockshin MD. Aspirin for primary thrombosis prevention in the antiphospholipid syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in asymptomatic antiphospholipid antibody-positive individuals, *Arthritis Rheum*, **2007**, *7*, 2382-91
2. Wang Y., Xu P., Li X., Nie K., Tuo M., Kong B., Chen J. Monitoring the hydrolyzation of aspirin during the dissolution testing for aspirin delayed-release tablets with a fiber-optic dissolution system, *J Pharm Analysis*, **2012**, *2*, 386-389