

USP43- NF38-6076 メソッドに従った スクロース中の総亜硫酸 (SO_2) の測定

Cary 3500 UV-Vis 分光光度計による時間の短縮と誤差要因の
低減



著者

Dr. Wesam Alwan
Dr. Mathieu Rault
Agilent Technologies, Inc.
Melbourne, Victoria, Australia

はじめに

医薬品賦形剤は医薬製剤に含まれており、治療活性のためではなく、製造プロセスの改善、安定性やバイオアベイラビリティの補助、患者の受容性の改善のために使用されます (1)。スクロース ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) は医薬品業界で最も一般的に使用される甘味料であり、経口薬の不快感を隠すために用いられるほか、防腐剤として機能する場合や、水菓の粘性の強化に使用されることがあります。

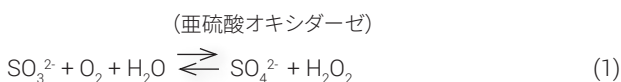
医薬製剤に使用されるスクロースの安全性と品質を確保するには、不純物の正確な測定が必要です。亜硫酸はスクロースに含まれる一般的な不純物です。米国薬局方メソッド USP43-NF38-6076 (2) には、UV-Vis 分光光度計を用いてスクロース中の総亜硫酸を測定するための酵素学的メソッドが記載されています。

この研究では、同 USP メソッドに従ったスクロース中の総亜硫酸の測定における Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計の利点を示します。

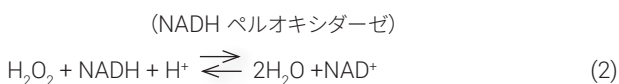
実験方法

バックグラウンド

USP43-NF38-6076 メソッドは、次の反応式に示すように、亜硫酸が亜硫酸オキシダーゼによって酸化され、酸素の存在下で硫酸と過酸化水素を生成する反応を利用しています。



その後、下の反応式 2 に示すように、形成された過酸化水素は、還元ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) の存在下で、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドペルオキシダーゼ (NADH ペルオキシダーゼ) によって還元されます。



反応中に形成された NAD^+ の量は、サンプル中の亜硫酸の量に比例します。NADH の消費量は、340 nm の吸光度を測定することによって測定できます。

総亜硫酸の濃度は、ブランクとサンプルの両方の差 ($A_1 - A_2$) を計算して求めることができます。 A_1 は酵素反応の開始時の吸光度です。 A_2 は酵素反応の終了時の吸光度です。 $\Delta A_{\text{sulfite}}$ を求めるためには、ブランクの吸光度差 ($A_1 - A_2$) をサンプルの吸光度差 ($A_1 - A_2$) から減算します。

SO_2 としての亜硫酸濃度 [g/L] は、次のように計算できます。

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

ここで：

V = 最終容量 [mL]

Mol.Wt = SO_2 の分子量 [g/mol] (3)

ϵ = 340 nm での NADH の吸光係数 = 6300

[$\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]

d = 光路長 [cm]

v = サンプル量 [mL]

実験方法

サンプル調製

サンプル 1 およびサンプル 2 溶液： サンプル 1 を調製するために、2.0 グラムのスクロース (Sigma Aldrich、CAS 番号 57-50-1) を 5.0 mL の蒸留水に溶解して、最終濃度を 400 mg/mL にしました。サンプル 2 では、市販 (地域のスーパーで購入) のスクロース 2 グラムを使用し、同じ手順を繰り返しました。

亜硫酸の標準溶液 (80 ppm SO_2)： 157.5 mg の無水亜硫酸ナトリウムを 1.0 L の蒸留水に溶解して、最終濃度を 0.1575 mg/mL にしました。

リファレンス溶液： 4.0 グラムのスクロース (Sigma Aldrich、CAS 番号 57-50-1) を 5.0 mL 蒸留水に溶解しました。次に、前述の亜硫酸の標準溶液を 0.5 mL 加えて、この結果できた溶液を蒸留水で希釈して 10.0 mL にしました。

標準溶液： 1.0 g のクエン酸を 1.0 L 計量フラスコに入れて 1.0 L の蒸留水で溶解しました。その後、800 mg の無水亜硫酸ナトリウム (Merck、CAS 番号 7757-83-7) を正確に計量して、溶液に加えしました (SO_2 としての最終濃度 ~ 400 mg/L)。原液を適切な量の 1 g/L クエン酸溶液で希釈して、複数の亜硫酸標準溶液 (0 ~ 400 mg/L、表 1) を調製しました。

表 1. 標準溶液の濃度

標準溶液の番号	濃度 (mg/L)
標準溶液 1	0
標準溶液 2	67
標準溶液 3	135
標準溶液 4	203
標準溶液 5	270
標準溶液 6	338
標準溶液 7	407

酵素キット：総亜硫酸 (SO_2) 酵素キット、表 2 (Megazyme、製品コード：K-ETSULPH)

表 2. Megazyme の酵素キットの内容

ボトル番号	成分
1	バッファ
2	NADH
3	NADH ペルオキシダーゼ懸濁液
4	亜硫酸オキシダーゼ懸濁液

キュベット：この実験では、容積 3.5 mL、光路長 10 mm の標準石英製キュベットと、星型のマグネティックスターラを使用しました。

機器とメソッド

すべての測定に、Agilent Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計を使用しました (図 1)。メソッドパラメータを表 3 に示します。



図 1. Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計

表 3. 機器パラメータ。NADH 消費量をモニタリングするために、単波長における吸光度を時間の経過とともに測定しました (パラメータ 1)。反応の前後の NADH 消費量を測定するために、溶液の吸光度を波長範囲で繰り返しスキャン測定しました (パラメータ 2)。酵素キットに付属の手順書では、ベースライン測定に空気の使用を推奨しています。

パラメータ	パラメータ 1	パラメータ 2
波長 (nm)	340	300 ~ 400
シグナル平均化時間 (s)	5	0.2
データ間隔 (nm)	N/A	1
スペクトルバンド幅 (nm)	2	2
攪拌速度 (rpm)	500	500
ベースライン	空気	空気
時間 (分)	45	4
スキャンスピード (nm/min)	N/A	300
スキャンの間隔 (s)	N/A	0

各キュベットは、表 4 に記載のように、ピペットを使用して総容量 3.340 mL で充填しました。キャップを付ける前に、星型スターラを各キュベット内に入れました。サンプルの混合は、Cary 3500 の攪拌機能を 500 rpm に設定して行いました。約 4 分の攪拌後に、溶液 (A1) の吸光度を測定しました。その後、亜硫酸オキシダーゼを加えて反応を開始しました。溶液 (A2) の吸光度を約 45 分後の反応終了時に測定しました。Cary 3500 はこの実験に適しており、ソフトウェア制御でキュベット内を攪拌する機能を備え、サンプルの均一性を確保できます。この機能により、スパチュラによる混合やキュベットを逆さにした混合が不要になり、サンプルの損失や汚染を防止することができます。

表 4. サンプル、リファレンス、標準を調製するために各キュベットに加える各試薬液および蒸留水の量

溶液	ブランク	サンプル	リファレンス	標準溶液 (0 ~ 407 ppm)
蒸留水	2.60 mL	0.6 mL	0.6 mL	2.50 mL
測定対象の溶液	-	2.0 mL	2.0 mL	0.10 mL
バッファ	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 ペルオキシダーゼ	0.02 mL	0.02 mL	0.02 mL	0.02 mL
亜硫酸オキシダーゼ	0.02 mL	0.02 mL	0.02 mL	0.02 mL

表 1 に、7 つの各標準溶液の濃度を示します。オプションの Agilent OpenLab ソフトウェアと、機器に付属の Cary UV ワークステーションソフトウェアを使用して、測定を実施しました。OpenLab は、21 CFR Part 11 および Annex 11 のデータインテグリティ要件に準拠するためのツールを備えています。これらのツールには、実施されたすべての変更を検索可能な監査証跡が含まれています。

結果と考察

USP メソッドに準拠したスクロースサンプル中の総亜硫酸の定量分析

USP43-NF38 モノグラフに従ってスクロース中の総亜硫酸含有量 (SO₂) を測定するために、約 340 nm で生じる最大の吸光度を反応の開始時 (A₁) と終了時 (A₂) に記録する必要があります。その後、これらの値を、ブランク溶液で得られた対応する値から差し引きます。サンプル溶液の吸光度の差 (A₁ - A₂) は、リファレンス溶液の吸光度の値の吸光度の差の半分以下となる必要があります。

Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計で測定したスクロースサンプル中の $\Delta A_{\text{sulfite}}$ は、サンプル 1 およびサンプル 2 それぞれで、0.0023 Abs と 0.0044 Abs でした (表 5)。いずれのサンプルも $\Delta A_{\text{sulfite}}$ はリファレンスの半分未満であり、USP で指定された許容範囲内に収まりました。この結果は、Cary 3500 がスクロース中の亜硫酸不純物の測定に適していることを示しています。

表 5. スクロースサンプル中の総亜硫酸 (SO₂) の測定

エントリ	A ₁	A ₂	A ₁ -A ₂	$\Delta A_{\text{sulfite}}$	総亜硫酸 (g/L)	総亜硫酸 (ppm)
サンプル 1	1.8805	1.6444	0.2360	0.0069	0.0023	2.3671
サンプル 2	1.8951	1.6529	0.2422	0.0131	0.0044	4.4722
リファレンス	1.8957	1.4572	0.4385	0.2094	0.0711	71.125

標準溶液中の総亜硫酸の定量分析

Cary 3500 マルチセル UV-Vis は、8 つのキュベット位置の同時測定が可能です (7 個のサンプルと 1 個のリファレンス)。300 ~ 400 nm の範囲の波長スキャンを 12 回実行して (反応開始前、反応中、終了後)、7 つの標準溶液を同一条件下で同時にモニタリングしました (図 2)。複数のサンプル/標準溶液を同時に測定できるため、環境やオペレータに起因する分析のばらつきや、その結果として生じるデータ精度に及ぼすリスクを排除できます。Cary UV ワークステーションのカイネティクスアプリケーションでは、単波長による測定と、一定波長範囲のスキャン測定のどちらかを選択できます。

7 つの標準溶液それぞれの吸光度 (A₁) を同時に、Cary UV ワークステーションのカイネティクスアプリケーションを使用して測定しました。吸光度を 300 ~ 400 nm で 4 分間 (12 スキャン) 測定しました。その後、20 μ L の亜硫酸オキシダーゼ懸濁液をピペットで各標準溶液に順次加えて、混合しました。NADH 消費量は、カイネティクスアプリケーションを使用して、吸光度の低減により 45 分間、340 nm でモニタリングしました。標準溶液 (A₂) の吸光度は、反応の終了時に、表 3 に記載された測定吸光度 (A₁) と同じパラメータ (パラメータ 2) を使用して測定しました。MS Excel にデータをエクスポートし、式 3 に記載されているように総亜硫酸 (SO₂) を計算しました。結果を表 6 にまとめています。

表 6. 計算された各標準溶液の総亜硫酸 (SO₂) 濃度

標準溶液	A ₁	A ₂	A ₁ -A ₂	ΔA _{sulfite}	総亜硫酸 [g/L]	総亜硫酸 [ppm]	調整された総亜硫酸 [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

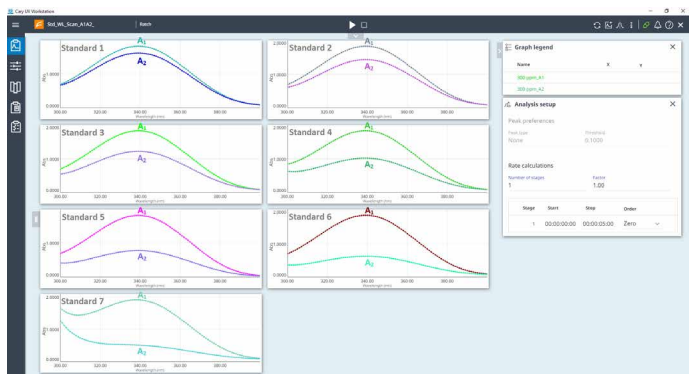


図 2. Cary UV ワークステーションのカイネティクスアプリケーションを Cary 3500 マルチセル UV-Vis と組み合わせることで、7つの標準溶液を同時に測定できました。7つの各標準溶液の反応の開始時 (A₁ ラベル付) と反応の終了時 (A₂ ラベル付) の波長スキャン (300 ~ 400 nm) を重ね表示しています。

時間対 NADH の消費量のモニタリング

Cary UV ワークステーションのカイネティクスアプリケーションを使用して、亜硫酸オキシダーゼ添加後の NADH の消費量をモニタリングしました。各標準溶液の吸光度を 340 nm で 45 分間モニタリングして、7 つすべての標準溶液を同時に測定しました (図 3)。各標準溶液を個別に測定する場合、完了までに 5 時間以上かかる可能性があります。上述の手法は大幅な時間短縮を実現します。Cary 3500 は、高速 (最大 250 データポイント/秒) データ採取レートと、可動部なしで広い測光範囲を特長としています。これらの特長により、いずれの測定方法においても高精度のデータを確実に収集できます。



図 3. Cary 3500 UV-Vis システムで同時に測定した 7 つの標準溶液の時間ベースの吸光度測定

結論

Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計は、同時にモニタリングされた 7 つの標準溶液の NADH 消費量を 1 回の実験でモニタリングできました。各標準溶液を個別に測定する場合と比較して、この手法では測定時間を 5 時間以上短縮できました。同時測定により、7 つすべての標準溶液を同一条件下で測定することも可能になり、室温の変化など、測定のあらゆるばらつきを排除できます。

スクロース中の総亜硫酸含有量を USP43-NF38 メソッドに従って測定しました。複数サンプルを同時に測定することで、環境、オペレータ、機器に起因する誤差の可能性を低減し、データ品質を向上できます。オプションの Agilent OpenLab ソフトウェアを用いて、データ採取プロセスにおいて Part 11/Annex 11 コンプライアンスに対応しました。

Cary 3500 のソフトウェア制御の攪拌機能により、測定時間を通して、キュベット内ですべての反応物を混合しました。

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.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2021
Printed in Japan, October 12, 2021
5994-3930JAJP
DE44467.2379976852