

# 离子色谱法测定药用辅料蔗糖中亚硫酸根的含量

LC-460

**摘要：** 本文使用岛津抑制型离子色谱仪建立了药用辅料中亚硫酸根的分析方法。方法采用氢氧化钾淋洗液和阴离子交换色谱柱，使用外标法定量，亚硫酸根在 0.1  $\mu\text{g/mL}$ ~10.0  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内，线性相关系数大于 0.9999，仪器检出限为 0.017  $\mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限为 0.058  $\mu\text{g/mL}$ 。使用 0.10  $\mu\text{g/mL}$ 、0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、10.0  $\mu\text{g/mL}$  的标准溶液分别连续进样 6 针，保留时间的 RSD 在 0.18%~0.19% 之间，峰面积的 RSD 在 0.87%~2.23% 之间。药用辅料蔗糖中亚硫酸根加标回收率在 90.83%~101.13% 之间。

**关键词：** 离子色谱法 药用辅料蔗糖 亚硫酸根

## 技术特点：

- ❖ 方法前处理简单，灵敏度高，仪器检出限可以做到 0.1  $\mu\text{g/mL}$  以下。
- ❖ 分离度高，亚硫酸根与硫酸根分离度为 1.94，可避免出现样品测定的假阳性。

蔗糖由一分子葡萄糖的半缩醛羟基与一分子果糖的半缩醛羟基彼此脱水缩合而成，分子式为  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ，通常由甘蔗、甜菜制得。蔗糖作为常用的药用辅料，在中药及化学药物制剂中常作为黏合剂、增溶剂、甜味剂及赋性剂等，而应用广泛。近年来，疫苗等生物制剂快速发展，蔗糖也常作为冻干保护剂应用其中。

在蔗糖的制糖工艺中，常采用亚硫酸法的清净工艺，此流程可能会造成亚硫酸盐的残留。而亚硫酸盐具有一定毒性，可与蛋白质的巯基发生反应；同时，亚硫酸盐也可能影响钙的吸收，破坏 B 族维生素等，

从而对人体造成潜在危害。

因此，国际食品、制药行业等均对亚硫酸盐的添加及残留有着严格的控制。在美国、日本及欧洲药典中对于亚硫酸盐的残留量均有限量要求。而现行《中国药典》蔗糖品种项下并未收载亚硫酸盐检查项，在质量控制方面存在风险。

常见的亚硫酸盐测定方法主要有分光光度法、碘量法、滴定法、酶法等，存在在专属性不强、操作繁琐、定量不准确等问题。本文使用岛津抑制型离子色谱仪建立了药用辅料蔗糖中亚硫酸根的检测方法，可为相关从业人员提供参考。

## 实验部分

### 1.1 仪器

岛津离子色谱仪 HIC-ESP，配置信息如下：

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A3
输液泵：	LC-20AD SP×2	柱温箱：	CTO-20AC
自动进样器：	SIL-20AC XR	检测器：	CDD-10A VP
抑制器：	SHY-A-6	色谱工作站：	Labsolutions Ver. 5.118

### 1.2 分析条件

色谱柱：	IC SI-36 4D (150 mm×4.0 mm I.D., 3.5 $\mu\text{m}$ )		
流动相：	A: 100 mmol/L 氢氧化钾水溶液；B: 水		
进样体积：	10 $\mu\text{L}$	流速：	0.7 mL/min
柱温：	40 $^{\circ}\text{C}$	抑制电流：	55 mA
洗脱方式：	梯度洗脱，B 相初始浓度为 85%，时间程序见表 1		

表 1 流动相梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
18.00	Pumps	Pump B Conc.	85
18.10	Pumps	Pump B Conc.	75
20.00	Pumps	Pump B Conc.	75
20.10	Pumps	Pump B Conc.	85
30.00	Controller	Stop	

### 1.3 标准品溶液的配制

称取亚硫酸钠适量，用 1% 甲醛溶液溶解，配制成 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的亚硫酸根标准溶液。准确量取亚硫酸根标准溶液适量，用 1% 甲醛溶液稀释成 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  混合标准溶液。分别取 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  混合标准溶液适量，用水配制成 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准系列工作液。

### 1.4 样品前处理

准确称取 1 g 的蔗糖辅料，用 1% 甲醛溶液充分溶解，并用水定容至 5 mL。过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜。上机待测。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 稳定剂的使用

实验中发现，高浓度的亚硫酸盐极易被氧化转化为硫酸盐而影响测定结果，为使结果更加准确，样品及标准溶液须加入稳定剂。参考相关文献后，本文选择甲醛作为稳定剂。在高浓度的标准溶液的配制和样品溶解过程中加入 1% 甲醛溶液。甲醛可与  $\text{SO}_2$  在水溶液中可以生成  $\alpha$ - 羟基磺酸，反应过程见图 1。实验比较了不同的稀释溶剂（1% 甲醛溶液和纯水），对亚硫酸根的响应影响，同过实验发现，使用纯水作为稀释溶剂，检测的亚硫酸根响应更高，峰面积比用 1% 甲醛溶液高 3 倍左右，不同稀释溶剂比对色谱图如图 2 所示，这可能跟水能够促进  $\alpha$ - 羟基磺酸的解离有关。因此，确定选择使用 1% 甲醛溶液配制标准品储备液，使用纯水配制校准曲线工作溶液；同时样品前处理时加入 1% 甲醛溶解后，以纯水作为定容溶剂进行配制。

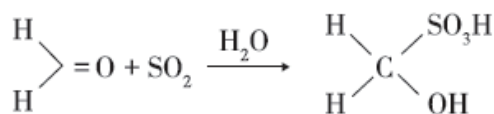


图 1 甲醛作为稳定剂的反应原理

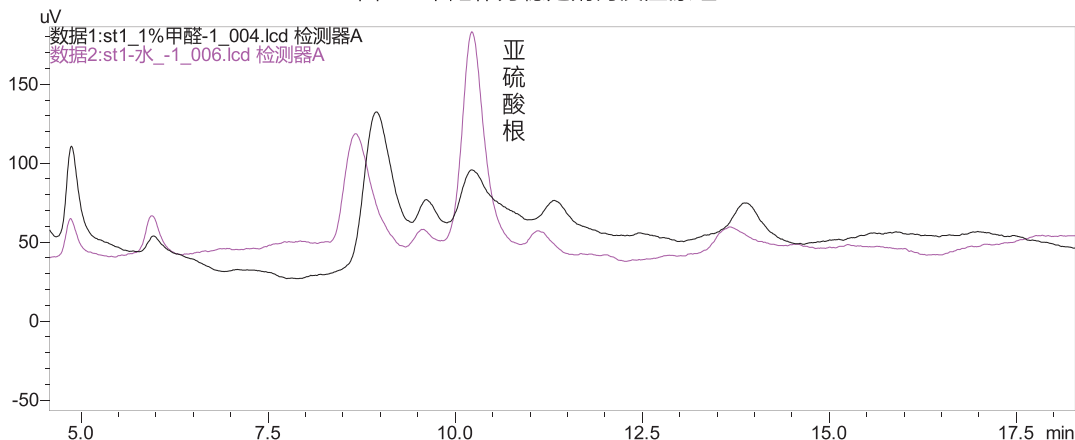


图 2 不同稀释溶剂配制的标准溶液的色谱图比较 (1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

同时考察了这种配制方式  $\text{SO}_3^{2-}$  溶液的稳定性，使用  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  的标准溶液进行了 12 h 的稳定性实验，发现在 12 h 内  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  标准溶液保持稳定。不同时间的  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  的标准溶液的色谱图，如图 3 所示。

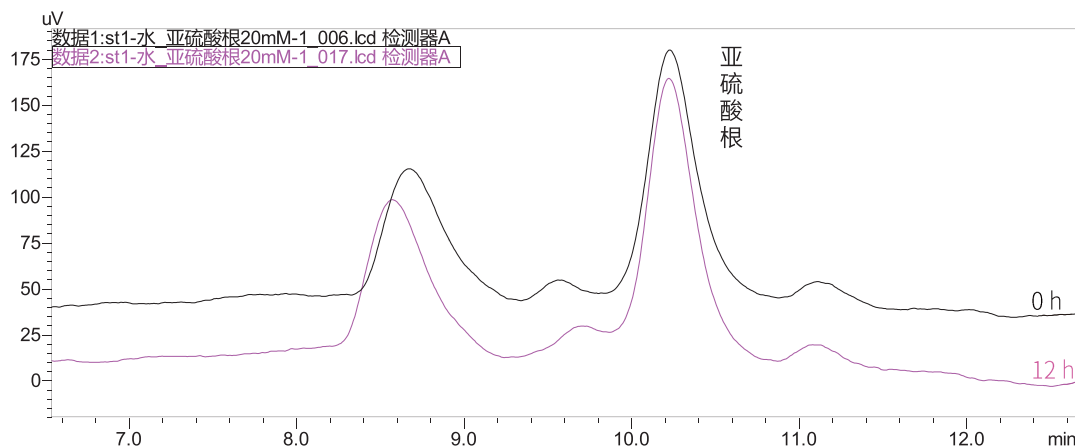


图 3 甲醛稳定剂作用下  $\text{SO}_3^{2-}$  溶液在不同时间的稳定性色谱图 ( $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ )

## 2.2 淋洗液浓度的考察

实验考察了不同浓度的氢氧化钾淋洗液对色谱分离的影响，当淋洗液浓度为  $20 \text{ mmol}/\text{L}$ ，发现  $\text{SO}_3^{2-}$  与  $\text{SO}_4^{2-}$  的峰分离度为 1.7，但在目标峰前的干扰峰未完全分离；当淋洗液浓度为  $15 \text{ mmol}/\text{L}$  时，分离明显改善，如图 4 所示。因此，本实验采用  $15 \text{ mmol}/\text{L}$  氢氧化钾淋洗液进行洗脱分离。

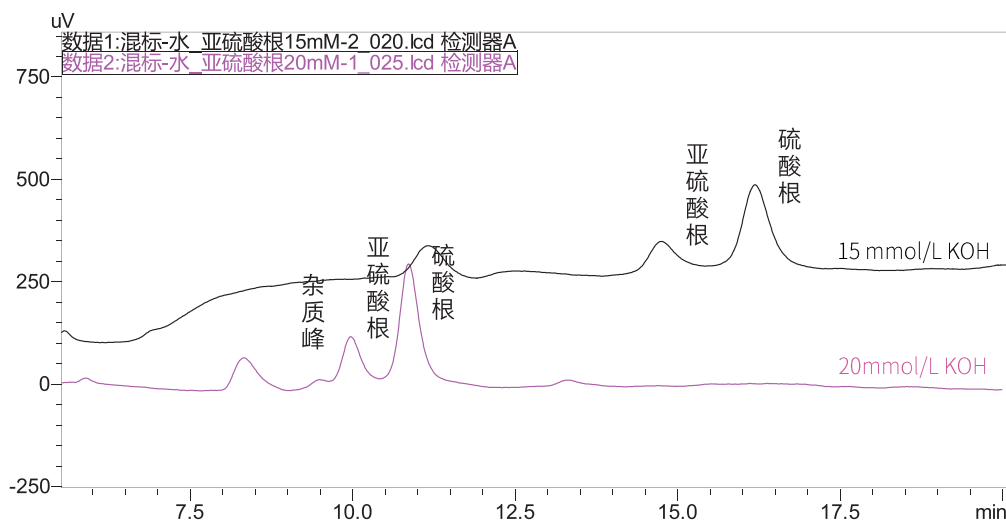


图 4 不同浓度淋洗液条件下亚硫酸根与硫酸根混合标准溶液色谱图对比 ( $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ )

## 2.3 亚硫酸根与硫酸根的分离考察

由于亚硫酸盐容易被氧化为硫酸盐，因此，亚硫酸根与硫酸根在样品中可能共存，根据文献报道，硫酸根与亚硫酸根出峰时间比较接近。若不能完全分离的话，可能会造成结果不准确或者样品的假阳性。本实验使用亚硫酸根及硫酸根混合标准溶液，考察二者峰的分离度，如图 5 所示，分离度为 1.94，可完全分离。该方法专属性良好。

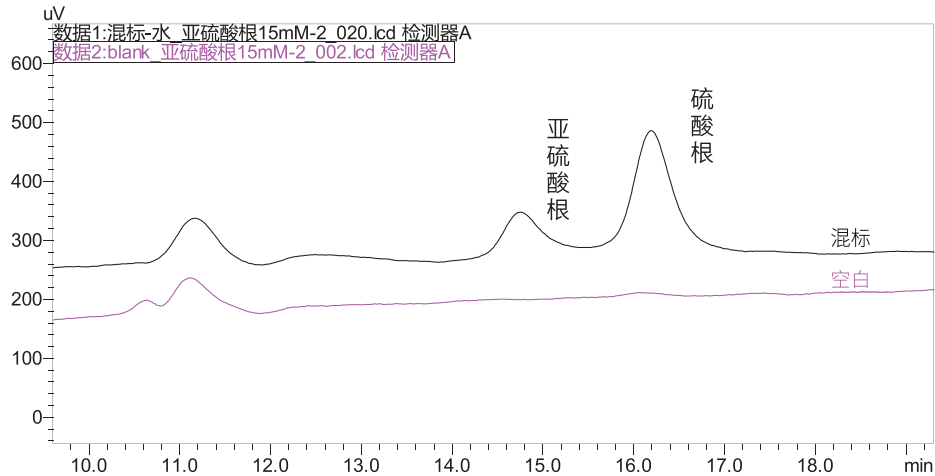


图 5 亚硫酸根与硫酸根混合标准溶液色谱图 (1.0 µg/mL)

### 2.4 校准曲线、检出限和定量限

按照 1.2 项下分析条件，标准系列溶液按照浓度从低到高的顺序依次上机测定，分别以亚硫酸根的质量浓度为横坐标，其对应的峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，如图 6 所示。亚硫酸根在 0.1 µg/mL-10.0 µg/mL 浓度范围内线性关系良好，相关系数  $r$  大于 0.9999，各校准点准确度在 97.8%-107.5% 之间。根据最低浓度点标样数据，以 3 倍信噪比计算检出限，以 10 倍信噪比计算定量限，见表 1。

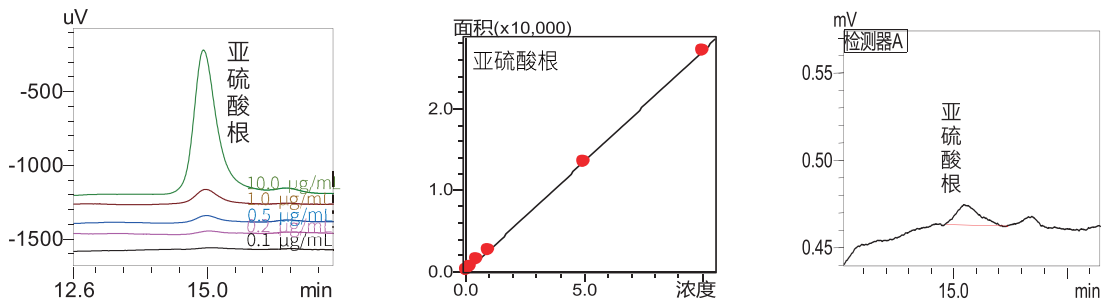


图 6 各浓度点色谱图、校准曲线以及定量限 (0.1 µg/mL) 色谱图

表 1 亚硫酸根各组分的校准曲线及检出限

化合物	校准曲线	相关系数 R	准确度	检测限 (µg/mL)	定量限 (µg/mL)
亚硫酸根	$Y = 2709.55X - 12.6008$	0.9999	97.8%-107.5%	0.017	0.058

### 2.5 精密度

取低、中、高三个不同浓度点标准溶液，连续进样 6 次，考察仪器的精密度，保留时间 RSD 在 0.18%~0.19% 范围内，峰面积 RSD% 在 0.87%~2.23% 范围内。具体结果见表 2，仪器精密度良好。

表 2 精密度结果 (n=6)

化合物	0.1 µg/mL		1.0 µg/mL		10.0 µg/mL	
	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)
亚硫酸根	0.19	1.25	0.19	2.23	0.18	0.87

## 2.6 实际样品测定及回收率测定

按照以上建立的方法对市售的药用辅料蔗糖进行测定，该样品中未检出亚硫酸盐。向市售的药用辅料蔗糖原料样品中分别添加含量为 0.6 mg/kg、2.5 mg/kg、30.0 mg/kg 的 3 个浓度水平的亚硫酸根标准溶液，进行回收率试验，按照所建立的方法进行样品处理及测定。每个浓度水平重复 3 份平行样品，计算加标回收率和相对标准偏差（RSD）。结果如图 7 和表 3 所示。

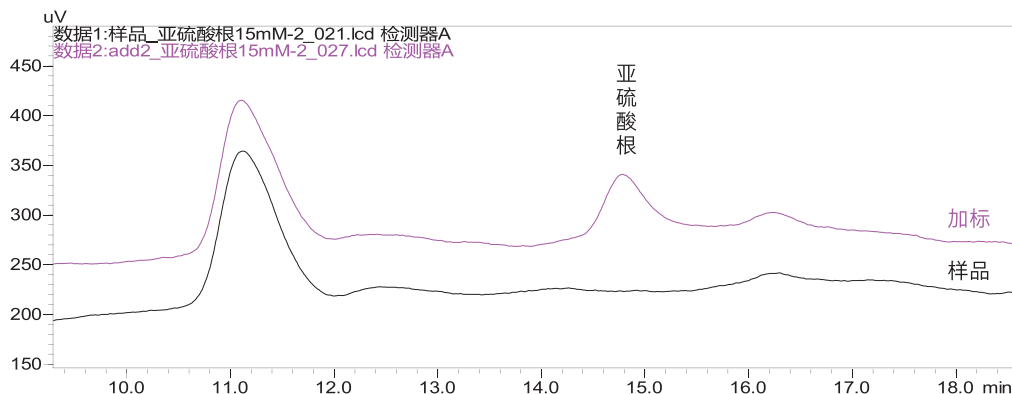


图 7 样品及加标 (2.5 mg/kg) 的色谱图比对

表 3 准确度结果 (n=3)

化合物	样品本底含量 (mg/kg)	加标浓度水平 (mg/kg)	加标结果 (mg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
亚硫酸根	N.D.	0.6	0.54	90.83	0.92
		2.5	2.52	101.13	0.11
		30.0	30.21	100.81	0.64

N.D. 表示未检出

## ■ 结论

本文使用岛津抑制型离子色谱仪，建立了药用辅料蔗糖中亚硫酸根的分析方法，并进行了方法学考察。实验结果表明，该方法前处理简单，专属性强，灵敏度高，可为相关从业人员提供参考。

岛津应用云

