



Application Note AN-C-198

Calciumacetat-Analyse in Calciumacetat-Kapseln

Methodenvalidierung nach U.S. Pharmacopeia (USP)

Calciumacetat fungiert als Phosphatbinder im Magen-Darm-Trakt und trägt dazu bei, hohe Phosphatwerte bei nierenkranken Patienten, die eine Dialysebehandlung erhalten, zu senken [1,2]. Um die strengen Qualitätsstandards für pharmazeutische Produkte zu erfüllen, müssen Hersteller und Labors validierte Methoden aus der United States Pharmacopeia - National Formulary (USP-NF) anwenden. In der Vergangenheit umfassten diese Methoden die Titration oder die Flüssigkeitschromatographie (LC) mit UV-Detektion.

Im Rahmen ihrer Modernisierungsbemühungen hat die USP die Kalziummonographie aktualisiert und die ionenchromatographische Analyse (IC) aufgenommen, die einfacher und empfindlicher ist als frühere Methoden. Für den Calciumacetat-Assay spezifiziert die USP die Ionenchromatographie unter Verwendung einer Kationenaustauschersäule mit L76-Säulenmaterial und nicht suppressierter Leitfähigkeitsdetektion zur Quantifizierung der Calciumionenmenge in Calciumacetatkapseln [3]. Die aktuelle IC-Methode verwendet eine Metrosep C

6-150/4.0-Säule (L76), um Calcium von anderen Ionen in Calciumacetat-Kapseln zu trennen. Diese Methode wurde gemäß den USP General Chapters <621> Chromatography [4] und <1225> Validation of Compendial Procedures [5] validiert. Alle

PROBE UND PROBENVORBEREITUNG

Die Standardlösung enthält nominell 0,08 mg/ml des USP-Calciumacetat-Referenzstandards (Cat# 1086334) in Wasser. Sie wird durch genaues Abwiegen von 80,0 mg USP-Calciumacetat-Referenzstandard hergestellt und in einen sauberen 1000-mL-Messkolben überführt, mit Reinstwasser (UPW) aufgelöst und bis zur Marke aufgefüllt.

Für Probenstammlösungen, die nominell 6,7 mg/ml Calciumacetat enthalten, wird ein entsprechender Teil des Inhalts von mindestens 20 Kapseln in einen 2000-ml-Messkolben überführt. UPW wird zu etwa 40 % des Endvolumens des Messkolbens zugegeben, und

Akzeptanzkriterien für den Calciumacetat-Assay in der USP-Monographie "Calciumacetat-Kapseln" sind erfüllt.

die Lösung wird dann 30 Minuten lang unter intermittierendem Schütteln beschallt. Anschließend wird die Lösung bis zur Marke mit UPW aufgefüllt und durch 0,2 µm Filterpapier filtriert.

Für Probenlösungen, die nominell 0,08 mg/mL Calciumacetat enthalten, werden 5,97 mL der Probenstammlösung in einen sauberen 500-mL-Messkolben überführt. Dieser wird mit UPW verdünnt und bis zur Marke aufgefüllt. Alle Lösungen werden vor der Injektion 5 Minuten lang mit Ultraschall behandelt.

DURCHFÜHRUNG

Die Proben werden mit einem 919 IC Autosampler plus direkt in den IC injiziert (**Abbildung 1**).

Die Kationen werden mit einer Metrosep C 6 - 150/4.0-Säule (L76) getrennt und mit nicht suppressierter Leitfähigkeit detektiert (**Tabelle 1**). Die Laufzeit betrug 40 Minuten, was den Anforderungen der USP entspricht, die das 1,5-fache der Retentionszeit des Calcium-Peaks vorschreibt (hier: 24 Minuten).

Zur Quantifizierung wurde eine Ein-Punkt-Kalibrierung mit der Standardlösung von 0,08 mg/ml USP-Calciumacetat verwendet. Die Proben wurden **d r e i M a l g e m e s s e n**. Reproduzierbarkeitsuntersuchungen werden mit 6-fach-Injektionen durchgeführt.



Abbildung 1. Instrumentelle Einrichtung mit einem 930 Compact IC Flex Oven/Deg und einem 919 IC Autosampler plus.

Tabelle 1. Parameter für die IC-Methode gemäß USP-Monographie «Calciumacetat-Kapseln» [3].

Säulemit L76-Packung	Metrosep C 6 - 150/4.0
Eluent	0,75 mmol/L Dipicolinsäure + 1,7 mmol/L Salpetersäure
Fluss	0,9 ml/min
Temperatur	35 °C
Injektionsvolumen	10 µl
Detektion	Direkte Leitfähigkeit

ERGEBNISSE

Die Parameter der IC-Methode entsprachen den Anforderungen des USP-Tests für Calciumacetat (Tabelle 2). Die Chromatogramme wiesen keine Interferenzen oder Verunreinigungen auf, und der Calciumpeak eluierte nach 24 Minuten (Abbildung 2). Alle Ergebnisse der Validierungstests entsprachen den USP-Anforderungen. Die Säuleneffizienz war mit >5900 theoretischen Böden außergewöhnlich gut. Die relative Standardabweichung für eine 6-fache Standardinjektion betrug 0,4 % (USP-Anforderung <2,0 %). Die gemessene Menge an Calciumacetat in den Kapseln korrelierte gut mit der angegebenen Menge an Calciumacetat, z. B. betrug der berechnete Prozentsatz 102,6 % des angegebenen Gehalts (90,0-110,0 % ist akzeptabel) (Tabelle 2). Somit eignet sich die IC-Methode für die Bestimmung von Calcium in Calciumacetatkapseln.

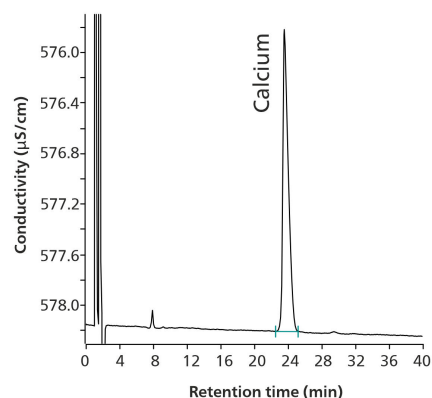


Abbildung 2. Chromatogramm eines Calcium-Peaks aus einer Calciumacetat-Kapselprobe, die 0,082 mg/mL Calciumacetat enthält (102 % Wiederfindung).

Tabelle 2. Beispielhafte Ergebnisse und USP-Anforderungen aus der Validierung der IC-Methode für Calciumacetat in Calciumacetat-Kapseln gemäß USP [3].

Parameter	Ergebnis	USP-Anforderung
Theoretische Böden	5909	NLT 1000
RSD % (n = 6)	0,406%	NMT 2,0 %
Prozentsatz der angegebenen Menge	102,6%	90,0–110,0%

FAZIT

Gemäß der USP-Monographie für Calciumacetat-Kapseln [3] erfolgt die Bestimmung des Calcium-Acetat-Gehalts mittels Ionenchromatographie (IC) auf einer Trennsäule mit L76-Packungsmaterial (hier: Metrosep C 6). Die Validierungsergebnisse erfüllten alle Anforderungen der Monographie und hielten sich

an die in den USP General Chapters <621> Chromatography und <1225> Validation of Compendial Procedures [4,5] festgelegten Richtlinien. Die beschriebene IC-Methode ist für die Quantifizierung von Calcium in Calciumacetatkapseln geeignet.

REFERENZEN

1. Biruete, A.; Gallant, K. M. H.; Lindemann, S. R.; et al. Phosphate Binders and Nonphosphate Effects in the Gastrointestinal Tract. *Journal of Renal Nutrition* **2020**, 30 (1), 4–10.
[DOI:10.1053/j.jrn.2019.01.004](https://doi.org/10.1053/j.jrn.2019.01.004)
2. Sekar, A.; Kaur, T.; Nally, J. V.; et al. Phosphorus Binders: The New and the Old, and How to Choose. *CCJM* **2018**, 85 (8), 629–638.
[DOI:10.3949/ccjm.85a.17054](https://doi.org/10.3949/ccjm.85a.17054)
3. U.S. Pharmacopeia. USP-NF Calcium Acetate Capsules. *Monograph*.
[DOI:10.31003/USPNF_M11403_08_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M11403_08_01)
4. <621> Chromatography, General Chapter; U.S. Pharmacopeia/National Formulary: Rockville, MD.
5. 1225 Validation of Compendial Procedures; General Chapter; U.S. Pharmacopeia/National Formulary: Rockville, MD.
[DOI:10.31003/USPNF_M99945_04_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M99945_04_01)

CONTACT

Metrohm Schweiz AG
Industriestrasse 13
4800 Zofingen

info@metrohm.ch

KONFIGURATION



Metrosep C 6 - 150/4.0

Das hochkapazitive C-6-Material macht die Trennsäule Metrosep C 6 - 150/4.0 zur optimalen Lösung für die Trennung von Standardkationen mit hohen Konzentrationsunterschieden bei vernünftiger Retentionszeiten. Trinkwässer mit tiefen Ammoniumgehalten lassen sich mit dieser Säule bestimmen.



930 Compact IC Flex Oven/Deg

Der 930 Compact IC Flex Oven/Deg ist das intelligente Compact-IC-Gerät mit **Säulenofen**, ohne **Suppression** und mit eingebautem **Degasser**. Das Gerät kann mit beliebigen Trenn- und Detektionsmethoden eingesetzt werden.

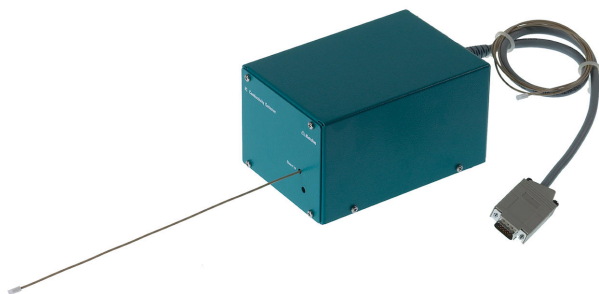
Typische Anwendungsgebiete:

- Anionen- und Kationenbestimmungen ohne Suppression mit Leitfähigkeitsdetektion
- Einfache Anwendungen mit UV/VIS- oder amperometrischer Detektion



919 IC Autosampler plus

Der 919 IC Autosampler plus erfüllt die Anforderungen von Laboren mit mittlerem Probenaufkommen. Mit ihm lassen sich die verschiedensten Ionenchromatographen des Metrohm-Sortiments automatisieren.



IC Conductivity Detector

Kompakter und intelligenter Hochleistungs-Leitfähigkeits-Detektor zu den intelligenten IC Geräten. Hervorragende Temperaturkonstanz, die gesamte Signalverarbeitung innerhalb des geschützten Detektorblocks und DSP – Digital Signal Processing – der letzten Generation garantieren höchste Präzision der Messung. Dank dem dynamischen Arbeitsbereich sind keine (auch nicht automatische) Bereichswechsel notwendig.