

КОНТРОЛЬ ЧИСТОТЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОНАТА КАЛЬЦИЯ МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ С ХРОМОВЫМ ТЕМНО-СИНИМ

УДК 544.138:544.65
БАК: 02.00.05

Николайчук П.А., ООО "Велфарм", pavel.nikolaychuk@kgsu.ru

Предложен простой метод определения глюконата кальция в смывных водах с промышленного оборудования при помощи хромового темно-синего. Метод основан на образовании окрашенного комплекса индикатора с ионами кальция и его последующем спектрофотометрическом определении. Градуировочный график линеен в интервале концентраций от 5 до 40 мг/л глюконата кальция, коэффициент молярного погашения составляет 39 000 м²/моль, предел обнаружения равен 2,8 мг/л, предел количественного определения равен 8,5 мг/л. Метод избирателен по отношению к наиболее часто используемым вспомогательным компонентам в препаратах глюконата кальция, обладает хорошей точностью (относительная погрешность не превышает 6%) и повторяемостью (относительное стандартное отклонение не превышает 6%), не требует длительной пробоподготовки и сложного аналитического оборудования и подходит для повседневного определения глюконата кальция на поверхности промышленного оборудования и в смывных водах с него.

ВВЕДЕНИЕ

Глюконат кальция является диетической добавкой, а также медикаментом, используемым в случаях низкого уровня кальция в крови, отравлений сульфатом магния [1] или верапамилом [2], при ожогах плавиковой кислотой [3] или при остановке сердца [1]. Препарат производится во всем мире в больших количествах [4]. В государственном реестре лекарственных средств Российской Федерации зарегистрировано 40 препаратов, содержащих глюконат кальция, выпускаемых 25 различными предприятиями (рис.1).

При производстве множества различных препаратов на совмещенной линии важным этапом фармацевтического производства является очистка фармацевтического промышленного оборудования и определение микрограммовых количеств производимых продуктов на его поверхности и в смывных водах при смене препарата [5]. Нормы остаточного содержания производимых продуктов на поверхности оборудования после его отмывки обычно не превышают десятков микрограмм. Согласно Европейской [6], Американской [7], Британской [8], Японской [9], Российской [10] и Международной [11] Фармакопеем глюконат кальция в препаратах и субстанциях анализируется по содержанию кальция методом комплексонометрического титрования с ЭДТА, однако этот метод недостаточно чувствителен для анализа микрограммовых количеств металла. Другие методы определения глюконата кальция включают в себя пламенно-эмиссионную спектрометрию [12], поляриметрию [13], титриметрическое определение йода [14] или спек-

трофотометрическое определение формальдегида [15, 16] после избирательного окисления глюконата кальция периодатами [14–16]. Однако пламенно-эмиссионная спектрометрия требует наличия сложного оборудования, поляриметрический метод недостаточно чувствителен, а окисление глюконата кальция периодатами времязатратно. Для обеспечения непрерывности производства метод анализа остаточных количеств препарата после очистки оборудования должен быть как можно более экспрессным, поэтому спектрофотометрический контроль является предпочтительным. В литературе описано множество спектрофотометрических методов определения катионов кальция. Все они отличаются простотой и доступными простыми реагентами, наиболее удобным считается метод с использованием индикатора хромового темно-синего (eriochrome blue SE) [17]. Целью настоящей работы является адаптация метода, предложенного в работе [17], для определения глюконата кальция в смывных водах с промышленного оборудования с использованием хромового темно-синего.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и оборудование. Глюконат кальция (98%) приобретен у ООО "Русхим". Гидроксид натрия (99%) приобретен у ООО "Реахим". Хромовый темно-синий (98%), кукурузный крахмал (97%), янтарная кислота (99%) и тальк (97%) приобретены у ООО "Ленреактив". Таблетки и внутривенные инъекции, содержащие глюконат кальция, приобретены в местных аптеках. Для моделирования смывов с промыш-



Рис.1. Глюконат кальция и его аптечные препараты

ленного оборудования использовались плоские пластинки из стали 12X12Н10Т. Для взвешивания использовались аналитические весы Sartorius Cubis MSA 225P-ICE-DI. Для отбора аликвот использовались различные микропипетки производства Thermo Fisher Scientific. Для фотометрических измерений использовался спектрофотометр Agilent Cary 60. Вся используемая посуда имела второй класс точности. Вода для приготовления растворов была предварительно очищена системой Sartorius Arrium Pro VF Ultrapure Water.

Приготовление окрашивающего реагента. В качестве окрашивающего реагента был приготовлен 0,004% раствор хромового темно-синего в 1М растворе NaOH.

Приготовление основного и рабочих растворов глюконата кальция. Готовился основной раствор глюконата кальция с концентрацией 50 мг/л. Рабочие растворы с различными концентрациями в интервале от 5 до 40 мг/л готовились соответствующим разбавлением дистиллированной водой. Рабочие растворы готовились заново ежедневно.

Приготовление раствора из таблеток и ампул. Таблетки аптечного глюконата кальция (содержание 500 мг) или ампулы (содержание 100 мг/мл) растворяли в воде и соответствующим разбавлением готовили рабочие растворы с концентрацией глюконата кальция 25 мг/л.

Приготовление модельных смывных вод. Аликвоты 10,0 мл приготовленного рабочего раствора, раствора из таблеток или раствора из инъекций с концентрацией глюконата кальция 25 мг/л помещали на подготовленные модельные пластинки, которые затем высушивались в вытяжном шкафу. Ватный тампон на проволоке погружался в пробирки с 10,0 мл воды, и с его помощью сухой остаток смывался с пластинок в течение 2 минут. И использованные ватные тампоны погружались в соответствующие пробирки с водой и перемешивались в течение 5 минут. Пробирки вместе с ватой нагревались в течение 5 минут на кипящей водяной бане, затем охлаждались. Полученные растворы переносили в мерные колбы объемом 10 мл, и объем раствора доводился до метки водой. Ожидаемая

концентрация глюконата кальция в полученных модельных смывных водах составляла 25 мг/л.

Общая процедура определения глюконата кальция. Аликвота 2,0 мл окрашивающего реагента смешивалась с аликвотой 4,0 мл рабочего раствора, раствора из таблеток или инъекций или модельного смыва в пробирке. Холостой раствор готовился смешиванием 2,0 мл окрашивающего реагента с 4,0 воды. Содержимое пробирок перемешивалось в течение 5 минут. Абсорбируемости испытуемых растворов измерялись в стеклянных кюветках с длиной оптического пути 1 см при длинах волн 533 и 615 нм относительно холостого раствора, и вычислялась разность между абсорбируемостями при 533 и 615 нм ($A_{533} - A_{615}$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выбор длин волн. Для подготовленных основного и холостого раствора глюконата кальция были записаны спектры относительно воды, а также в интервале длин волн от 450 до 750 нм с шагом 0,2 нм в стеклянной кювете с длиной оптического пути 1 см (рис.2). Дифференциальный спектр имеет максимум при длине волны 533 нм и минимум при 615 нм. В предыдущей работе [17] для определения использовалась только соответствующая максимуму длина волны, в настоящей работе для увеличения чувствительности используются длины волн, соответствующие и максимуму, и минимуму.

Выбор объема реагента. Основной раствор глюконата кальция (4,0 мл) смешивался с различными объемами окрашивающего реагента в интервале от 0,2 до 4,0 мл. Холостые растворы готовились в другой серии пробирок путем смешивания 4,0 мл воды с соответствующими количествами окрашивающего реагента. Растворы выдерживались в течение 5 минут. Абсорбируемости приготовленных растворов с различными количествами окрашивающего реагента измерялись при длинах волн 615 и 533 нм в стеклянных кюветках с длиной оптического пути 1 см относительно соответствующих им холостых растворов, и вычислялась разность

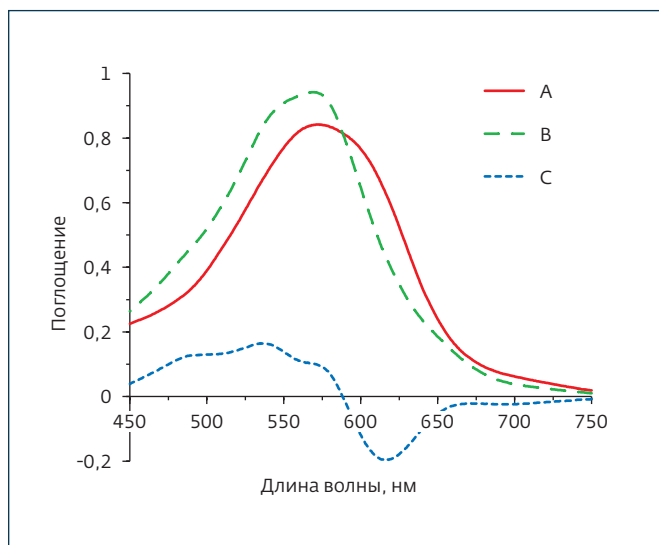


Рис.2. Абсорбционные спектры (А) хромового темно-синего в щелочной среде относительно воды, (В) комплекса хромового темно-синего с кальцием в щелочной среде относительно воды, (С) комплекса хромового темно-синего с кальцием относительно хромового темно-синего в щелочной среде

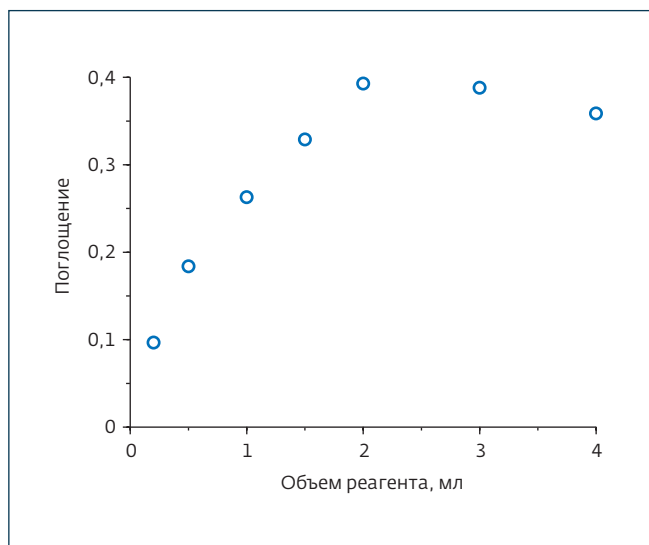


Рис.3. Зависимость абсорбируемости окрашенного продукта от объема добавленного окрашивающего реагента

$A_{533} - A_{615}$. Результаты показаны на рис.3. Максимальное значение абсорбируемостей получено при использовании объема реагента 2 мл. Данный объем выбран для всех последующих измерений.

Выбор времени выдерживания. Основной раствор глюконата кальция (4,0 мл) смешивался с 2,0 мл окрашивающего реагента. Соответствующие холостые растворы готовились в другой серии пробирок путем смешивания 4,0 мл воды с 2,0 мл окрашивающего реагента. Растворы выдерживались в течение различных промежутков времени в интервале от 0,5 до 30 минут. Абсорбируемости приготовленных растворов с различными временами выдерживания измерялись при длинах волн 615 и 533 нм в стеклянных кюветках с длиной оптического пути 1 см относительно соответствующих им холостых растворов, и вычислялась разность $A_{533} - A_{615}$. Результаты показаны на рис.4. Максимальное значение абсорбируемостей получено при времени выдерживания 3 минуты, и оно сохраняется в течение 30 минут. Для всех последующих измерений выбрано время выдерживания 5 минут.

Построение градуировочного графика. Были приготовлены рабочие растворы глюконата кальция с различными концентрациями в интервале от 5 до 50 мг/л и холостой раствор. В серии пробирок 4,0 мл приготовленных рабочих растворов смешивались с 2,0 мл окрашивающего реагента. Для холостого раствора 4,0 мл воды смешивалось с 2,0 мл окрашивающего реагента. Растворы выдерживались в течение 5 минут. Абсорбируемости приготовленных раство-

ров с различными временами выдерживания измерялись при длинах волн 615 и 533 нм в стеклянных кюветках с длиной оптического пути 1 см относительно соответствующих им холостых растворов, и вычислялась разность $A_{533} - A_{615}$. Результаты показаны в табл.1 и на рис.5. Зависимость разности абсорбируемостей ($A_{533} - A_{615}$) от концентрации глюконата кальция линейна в интервале концентраций от 5 до 40 мг/л. Эта разность использована для построения градуировочного графика и дальнейшей валидации метода.

Аналитические показатели. Аналитические показатели метода определены в соответствии с указаниями Государственной Фармакопеи Российской Федерации [10]. Метод проверен на линейность, пределы обнаружения и количественного определения, избирательность, правильность и повторяемость в пределах одного и нескольких дней.

Линейность. Согласно рис.5, зависимость разности абсорбируемостей при 615 и 533 нм от концентрации глюконата кальция линейна в интервале концентраций от 5 до 40 мг/л. Регрессионный анализ выполнен при помощи метода наименьших квадратов [18]. Дополнительно были вычислены оптимальный интервал концентраций по Рингбому [19], коэффициент молярного погашения и коэффициент чувствительности по Сэнделлу [20]. Параметры регрессионного уравнения приведены в табл.2.

Предел обнаружения и предел количественного определения. Предел обнаружения и предел количественного определения метода вычислены согласно работе [21]. Значения представлены в табл.2.

Избирательность по отношению к часто используемым вспомогательным компонентам. Согласно государственному реестру лекарственных средств Российской Федера-

27.02 – 01.03.2024

Россия, Москва,
ЦВК «ЭКСПОЦЕНТР»

Не только квадрат...
и не только черный



28-я международная
специализированная
выставка

Интерлакокраска



Реклама 12+

Салоны:

- «Обработка поверхности»
- «Покрyтия со специальными свойствами»
- «Защита от коррозии»

Организатор: АО «ЭКСПОЦЕНТР»

При поддержке:

- Министерства промышленности и торговли РФ
- Российского Союза химиков
- ОАО «НИИТЭХИМ»
- Ассоциации «Союзкраска»
- Российского химического общества им. Д.И. Менделеева

Под патронатом ТПП РФ

www.interlak-expo.ru



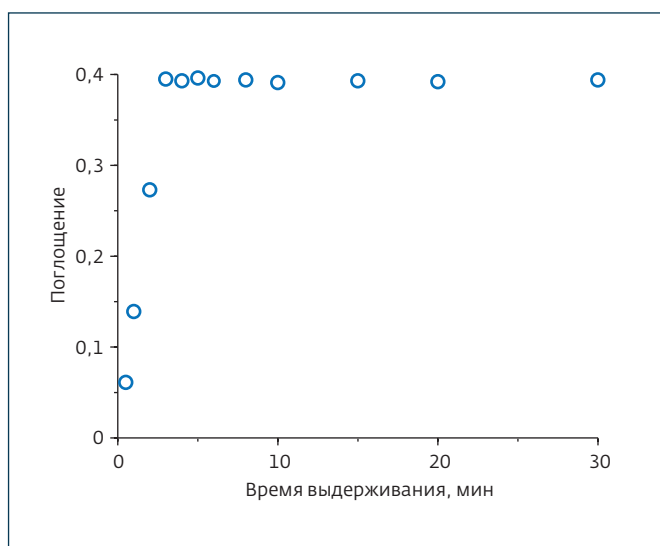


Рис.4. Зависимость абсорбируемости окрашенного продукта от времени выдерживания

ции обычными вспомогательными компонентами в таблетках глюконата кальция являются кукурузный крахмал и тальк, а во внутривенных инъекциях – янтарная кислота. Изучено возможное мешающее влияние со стороны этих веществ. Для этого приготовлены водный раствор янтарной кислоты концентрации 1 г/л, водная суспензия талька концентрации 1 г/л и 1% раствор кукурузного крахмала (приготовлен в кипящей воде и прокипячен в течение 30 минут). К аликвоте (4,0 мл) каждого из растворов добавлялось по 2,0 мл окрашивающего реагента, и растворы выдерживались в течение 60 минут. Изменения цвета растворов не

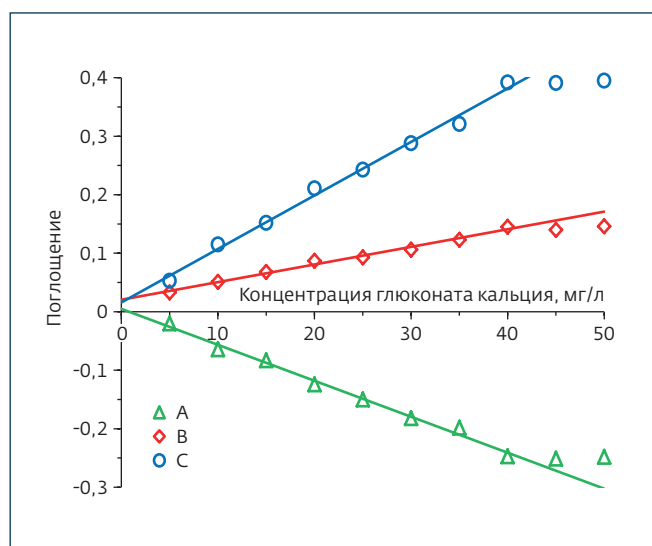


Рис.5. Зависимость абсорбируемости окрашенного продукта от концентрации глюконата кальция: (А) абсорбируемость при 615 нм, (В) абсорбируемость при 533 нм, (С) разность абсорбируемостей при 533 и 615 нм. Пунктирные линии соответствуют регрессионным зависимостям

обнаружено, что свидетельствует об отсутствии мешающего влияния со стороны исследованных вспомогательных компонентов. Однако стеарат кальция, будучи добавленным в таблетки в качестве вспомогательного компонента, может оказывать мешающее воздействие.

Правильность и повторяемость в пределах одного дня. Выполнено три серии экспериментов, в которых приготовлено десять рабочих растворов, десять растворов

Табл.1. Зависимость абсорбируемости окрашенного продукта от концентрации глюконата кальция

Концентрация глюконата кальция, мг/л	Абсорбируемость при 615 нм (A_{615})	Абсорбируемость при 533 нм (A_{533})	$A_{533} - A_{615}$
5	-0,020	0,032	0,052
10	-0,064	0,050	0,114
15	-0,083	0,068	0,151
20	-0,124	0,086	0,210
25	-0,149	0,093	0,242
30	-0,182	0,105	0,287
35	-0,197	0,122	0,319
40	-0,246	0,144	0,390
45	-0,250	0,140	0,390
50	-0,248	0,146	0,394

Табл.2. Параметры линейной регрессии зависимости разности абсорбируемостей окрашенного продукта при 615 и 533 нм от концентрации глюконата кальция, и аналитические параметры метода

Параметр	Значение
Наклон прямой и его доверительный интервал (f = 6, p = 95%), л/мг	0,0091 ± 0,0003
Пересечение и его доверительный интервал (f = 6, p = 95%)	0,016 ± 0,008
Значение R ²	0,993
Интервал линейности, мг/л	5–40
Оптимальный интервал концентраций по Рингбому, мг/л	20–40
Коэффициент молярного погашения и его доверительный интервал (f = 6, p = 95%), м ² /моль	(39 ± 1) · 10 ³
Коэффициент чувствительности по Сэнделлу и его доверительный интервал (f = 6, p = 95%), мкг/см ²	0,11 ± 0,04
Предел обнаружения, мг/л	2,8
Предел количественного определения, мг/л	8,5

из таблеток и десять растворов из инъекций с концентрациями глюконата кальция, равными 25 мг/л. Растворы обработаны, как описано в общей процедуре, измерены абсорбируемости окрашенных продуктов, концентрации растворов вычислены по регрессионному уравнению, и определены относительные погрешности и относительные стандартные отклонения. Результаты собраны в табл.3.

Повторяемость в пределах нескольких дней. Выполнено три серии экспериментов, в которых готовились рабочий раствор, раствор из таблеток и раствор из инъекций с концентрациями глюконата кальция, равными 25 мг/л в течение пяти последовательных дней. Растворы обработаны, как описано в общей процедуре, измерены абсорбируемости окрашенных продуктов, концентрации растворов вычислены по регрессионному уравнению, и определены относительные стандартные отклонения. Результаты собраны в табл.3.

Правильность и повторяемость для модельных смывных вод. Выполнено три серии экспериментов, в которых приготовлено десять модельных смывных вод из рабочих растворов, десять модельных смывных вод из растворов из таблеток и десять модельных смывных вод из растворов из инъекций с концентрациями глюконата кальция, равными 25 мг/л. Растворы обработаны, как описано в общей процедуре, измерены абсорбируемости окрашенных продуктов, концентрации растворов вычислены по регрессионному уравнению, и определены относительные погрешности и относительные стандартные отклонения. Результаты собраны в табл.4.

ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты показывают, что предложенный спектрофотометрический метод пригоден для определения глюконата кальция в смывных водах с промышленного оборудования. Метод быстрый и простой; он не

Табл.3. Правильность и повторяемость метода

Раствор	Относительная погрешность, %	Относительное стандартное отклонение в пределах одного дня, %	Относительное стандартное отклонение в пределах нескольких дней, %
Рабочий раствор, 25 мг/л	2,2	2,7	2,8
Раствор из таблеток, 25 мг/л	2,6	3,2	3,6
Раствор из внутривенных инъекций, 25 мг/л	2,4	3,0	3,4

Табл. 4. Правильность и повторяемость при анализе модельных смывных вод

Раствор	Относительная погрешность, %	Относительное стандартное отклонение, %
Смывная вода из рабочего раствора, 25 мг/л	4,2	4,8
Смывная вода из раствора из таблеток, 25 мг/л	5,1	5,7
Смывная вода из раствора из внутривенных инъекций, 25 мг/л	4,7	5,3

требует длительной пробоподготовки или сложного оборудования. Метод избирателен по отношению к широко используемым вспомогательным веществам, чувствитель-

лен (молярный коэффициент погашения 39 000 м²/моль, предел обнаружения 2,8 мг/л, предел количественного определения 8,5 мг/л), обладает правильностью (относительная погрешность для анализа фармацевтических препаратов не превышает 4%, относительная погрешность для анализа модельных промышленных смывных вод не превышает 6%, что приемлемо для их анализа) и повторяемостью (относительное стандартное отклонение не превышает 4% в пределах одного дня, 4% в пределах нескольких дней и 6% для анализа модельных смывов с промышленного оборудования). Градуировочный график линеен в диапазоне от 5 до 40 мг/л глюконата кальция с хорошим коэффициентом корреляции.

ВЫВОДЫ

Предложен простой спектрофотометрический метод определения глюконата кальция в смывных водах с промышленного оборудования с использованием щелочного раствора хромового темно-синего. Метод основан на образовании окрашенного комплекса между кальцием и индикатором и последующем колориметрическом определении образовавшегося продукта. Метод обладает хорошими аналитическими показателями, не требует длительной пробоподготовки и сложного лабораторного оборудования и подходит для повседневного анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Chakraborty A., Can A.S.** Calcium gluconate // StatPearls. StatPearls Publishing, 2022. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557463>
2. **Luscher T.F.** et al. Calcium gluconate in severe verapamil intoxication // *New England Journal of Medicine*. 1994. Т. 330. №10. С. 718–720.
3. **Roblin I.** et al. Topical treatment of experimental hydrofluoric acid skin burns by 2.5% calcium gluconate // *Journal of burn care & research*. 2006. Т. 27. №6. С. 889–894.
4. **Bao J.** et al. A kinetic study on air oxidation of glucose catalyzed by immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate // *Biochemical Engineering Journal*. 2001. Т. 8. №2. С. 91–102.
5. **Nassani M.** Cleaning validation in the pharmaceutical industry // *Journal of validation technology*. 2005. Т. 11. №4. С. 286–298.
6. *European Pharmacopoeia*. 8th edition. Strasbourg: Council of Europe, 2013.
7. *United States Pharmacopoeia*. 32nd edition. Available at <http://www.uspbpep.com/>
8. *British Pharmacopoeia 2016*. London: The Stationery Office, 2015.
9. *The Japanese Pharmacopoeia*. 17th edition, English version. Tokyo: The Ministry of Health, Labour and Welfare, 2016.
10. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*, 14th Edition Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation, 2018.
11. *The Internaitonal Pharmacopoeia*, 10th Edition. Available at <https://digicollections.net/phint/2020>
12. **da Silva Lyra W.** et al. Indirect determination of sodium diclofenac, sodium dipyron and calcium gluconate in injection drugs using digital image-based (webcam) flame emission spectrometric method // *Analytical Methods*. 2011. Т. 3. № 9. С. 1975–1980.
13. **Fisher H.J., Bailey E.M.** A Polarimetric Method for the Determination of Calcium Gluconate // *Journal of Association of Official Agricultural Chemists*. 1932. Т. 15. № 3. С. 461–466.
14. **Kuang-Paio C.** Determination of calcium gluconate by selective oxidation with periodate // *Journal of pharmaceutical sciences*. 1984. Т. 73. № 5. С. 681–683.
15. **Devani M.B.** et al. Spectrophotometric determination of calcium gluconate, mannitol and sorbitol in bulk powder and in dosage forms // *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1990. Т. 52. № 5. С. 231.
16. **Illner E.** Beitrag zur spektralkolorimetrischen Bestimmung von Calcium-D-Gluconat // *Pharmazie*. 1975. Т. 30. № 6. С. 407.
17. **Radin N., Gramza A.L.** Differential spectrophotometric determination of calcium // *Clinical Chemistry*. 1964. Т. 10. № 8. С. 704–720.
18. **Adrian R.** Research concerning the probabilities of the errors which happen in making observations, &c // *The Analyst; or Mathematical Museum*. 1809. Т. 1. № 4. С. 93–109.
19. **Ringbom A.** Über die Genauigkeit der colorimetrischen Analysenmethoden I // *Zeitschrift für analytische Chemie*. 1938. Т. 115. № 9. С. 332–343.
20. **Sandell E.B.** *Colorimetric Determination of Traces of Metals*. New York: Interscience Publishers, 1944.
21. **Shrivastava A., Gupta V.B.** Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods // *Chronicles of young scientists*. 2011. Т. 2. № 1. С. 21–25.



БИОТЕХМЕД

VIII ежегодный форум

БИОТЕХМЕД 2023

**ПРОМЫШЛЕННОСТЬ ДЛЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ.
БУДУЩЕЕ ОТРАСЛИ**

**9–10 октября 2023,
Сочи**

biotechmedconf.ru