

**Ćwiczenia laboratoryjne z przedmiotu nauczania:
„Chemia Ogólna i Nieorganiczna”
dla studentów I roku Kierunku Farmacja**

*Instrukcja wykonania ćwiczenia
Analiza farmakopealna wody oczyszczonej*

Opracowanie:
dr hab. n. med. Joanna Sikora, profesor uczelni

1. Monografia farmakopealna wody oczyszczonej

Poniżej przedstawiono fragment przykładowej monografii farmakopealnej wody oczyszczonej (AQUA PURIFICATA) na podstawie FP XII Tom II (2020, 04/2018:0008)).

AQUA PURIFICATA

04/2018:0008

AQUA PURIFICATA

Woda oczyszczona

Water, purified; Eau purifiée

H₂O m.cz. 18,02

DEFINICJA

Woda do wytwarzania produktów leczniczych, którym nie stawia się jednocześnie wymagań jałowości i apirogenności, jeżeli nie zostało inaczej uzasadnione i zatwierdzone.

Woda oczyszczona produkcyjna

Syn.⁽¹⁾: Woda oczyszczona do bezpośredniego użycia

WYTWARZANIE

Woda oczyszczona produkcyjna jest otrzymywana metodą destylacji, wymiany jonowej, odwróconej osmozy lub inną metodą z wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi odpowiadającej obowiązującym wymaganiom ustalonym przez organ upoważniony.

Woda oczyszczona produkcyjna jest przechowywana i rozprowadzana do produkcji w warunkach zabezpieczających przed wzrostem drobnoustrojów i wprowadzeniem innych zanieczyszczeń.

Całkowity węgiel organiczny lub substancje utleniające się. Wykonać badanie zawartości całkowitego węgla organicznego (2.2.44) ustalając wartość graniczną 0,5 mg/L lub wykonać alternatywne badanie zawartości substancji utleniających się: do 100 mL wody badanej dodać 10 mL *rozcieńzonego kwasu siarkowego OD* i 0,1 mL *roztworu nadmanganianu potasu (0,02 mol/L) RM*, i utrzymywać 5 min we wrzeniu; roztwór pozostaje jasnoróżowy.

Przewodność. Oznaczyć przewodność w pobranej próbce wody lub prowadzić pomiar w linii produkcyjnej, stosując podane poniżej warunki.

URZĄDZENIE

Naczynko konduktometryczne:

- elektrody z odpowiedniego materiału, np. ze stali nierdzewnej;
- wartość stałej naczynka: stała naczynka jest zazwyczaj poświadczona przez producenta, a następnie jest sprawdzana w odpowiednich odstępach czasu z użyciem certyfikowanego roztworu porównawczego o przewodności mniejszej niż 1500 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ lub przez porównanie z naczynkiem o znanej certyfikowanej stałej; stałą naczynka uznaje się za potwierdzoną, jeżeli zmierzona wartość wynosi $\pm 2\%$ wartości certyfikowanej, w przeciwnym przypadku należy dokonać ponownej kalibracji.

Konduktometr: dokładność 0,1 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ lub większa; wyznaczona w najniższym zakresie pomiarowym.

Kalibracja systemu (naczynko konduktometryczne i konduktometr):

- wobec jednego lub większej liczby odpowiednich certyfikowanych roztworów porównawczych;
- dokładność: $\pm 3\%$ mierzonej wartości przewodności powiększona o 0,1 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Kalibracja konduktometru: kalibrację prowadzi się dla każdego z używanych zakresów pomiarowych, po odłącze-

niu naczynka pomiarowego, stosując certyfikowane precyzyjne oporniki lub inne właściwe urządzenia, charakteryzujące się niepewnością pomiaru nie większą niż 0,1% wartości certyfikowanej.

Jeżeli naczynko konduktometryczne w linii produkcyjnej nie może być odłączone, kalibrację systemu można wykonać wobec skalibrowanego miernika przewodności z naczynkiem konduktometrycznym umieszczonym w linii przepływu wody, w pobliżu kalibrowanego naczynka.

Pomiar temperatury: tolerancja $\pm 2^\circ\text{C}$.

POSTĘPOWANIE

Zmierzyć przewodność właściwą bez kompensacji temperatury, lecz z jej jednoczesną rejestracją. Pomiar z kompensacją temperatury może być wykonany po odpowiedniej walidacji.

Woda badana spełnia wymagania, jeżeli zmierzona przewodność nie jest większa od wartości podanej w tabeli 0008.-2. dla temperatury, w której wykonano badanie.

Tabela 0008.-2. Wymagania dla przewodności właściwej w zależności od temperatury

Temperatura (°C)	Przewodność właściwa ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
0	2,4
10	3,6
20	4,3
25	5,1
30	5,4
40	6,5
50	7,1
60	8,1
70	9,1
75	9,7
80	9,7
90	9,7
100	10,2

Dla temperatury niepodanej w tabeli 0008.-2. obliczyć wymaganą wartość przewodności ekstrapolując dane dla najbliższej i najbliższej wyższej temperatury.

Zanieczyszczenia pierwiastkami. Jeżeli woda oczyszczona produkcyjna nie spełnia wymagań przewodności podanych w monografii *Woda do wstrzykiwań (0169)* produkcyjna, wykonywana jest analiza ryzyka zgodnie z rozdziałem 5.20. *Zanieczyszczenia pierwiastkami.* Analiza ryzyka powinna uwzględnić rolę wody w procesie wytwarzania, szczególnie gdy woda jest używana w procesie, ale nie jest potem obecna w produkcie końcowym.

WŁAŚCIWOŚCI

Wygląd: przezroczysta i bezbarwna ciecz.

BADANIA

Azotany: nie więcej niż 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Umieścić 5 mL wody badanej w probówce zanurzonej w wodzie z lodem, dodać 0,4 mL roztworu *chlorku potasu OD* (100 g/L), 0,1 mL roztworu *difenyloaminy OD* i kroplami, wstrząsając, 5 mL *kwasu siarkowego wolnego od azotu OD*. Przenieść probówkę do łaźni wodnej o temp. 50°C. Po 15 min niebieskie zabarwienie roztworu nie jest intensywniejsze niż zabarwienie roztworu porównawczego przygotowanego w tym samym czasie i w taki sam sposób używając mieszaniny 4,5 mL *wody wolnej od azotanów OD* i 0,5 mL *roztworu wzorcowego azotanów (2 $\mu\text{g NO}_3/\text{mL}$) OD*.

Glin (2.4.17): nie więcej niż 10 $\mu\text{g}/\text{L}$, jeżeli woda oczyszczona produkcyjna jest przeznaczona do sporządzania roztworów do dializy.

2. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wykonanie farmakopealnej analizy chemicznej (wg FP XI) otrzymanej próbki wody oraz interpretacja uzyskanych wyników, jak również wydanie opinii o spełnieniu (lub braku spełnienia) wymagań farmakopealnych stawianych danemu produktowi.

Każdy Student otrzymuje do analizy butelkę wody badanej (ok. 1000 mL) oraz probówkę Falcona zawierającą ok. 50 mL zagęszczonej 10-krotnie wody badanej (poprzez odparowanie), która powinna być wykorzystana wyłącznie do sprawdzenia obecności zanieczyszczeń w postaci metali ciężkich.

Zgodnie z definicją zawartą w farmakopei, „Woda oczyszczona produkcyjna” to woda wykorzystywana do wytwarzania produktów leczniczych, którym nie stawia się jednocześnie wymagań jałowości i apirogenności, jeżeli nie zostało inaczej uzasadnione i zatwierdzone. Woda oczyszczona produkcyjna jest otrzymywana metodą destylacji, wymiany jonowej, odwróconej osmozy lub inną metodą, z wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, odpowiadającej obowiązującym wymaganiom ustalonym przez organ upoważniony. Woda oczyszczona produkcyjna jest przechowywana i rozprowadzana do produkcji w warunkach zabezpieczających ją przed wzrostem drobnoustrojów i wprowadzeniem innych zanieczyszczeń.

Zgodnie z przepisami, woda oczyszczona produkcyjna wytwarzana m.in. w aptekach, podlega okresowej kontroli jakości mikrobiologicznej i fizykochemicznej. Podczas produkcji i przechowywania wody oczyszczonej produkcyjnej należy podjąć odpowiednie działania, aby woda spełniała wymagania farmakopealne dotyczące właściwości fizykochemicznych, w tym celu, zgodnie z FP XI (2017), Tom II, 01/2009:0008 oraz FP XI Supplement (2018), 04/2018:0008) powinno się okresowo kontrolować:

- ✓ przewodność właściwą,
- ✓ zawartość substancji utleniających się,
- ✓ obecność zanieczyszczeń w postaci azotanów,
- ✓ obecność zanieczyszczeń w postaci metali ciężkich.

Jakość wody wytwarzanej w aptece powinna być poddawana kontroli, której częstotliwość zależy od objętości wody wytwarzanej przez destylator:

- ✓ do 25 litrów dziennie – nie rzadziej niż co 90 dni,
- ✓ od 25 litrów do 150 litrów dziennie – nie rzadziej niż co 30 dni,
- ✓ ponad 150 litrów dziennie – zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Wytwarzania (ang. Good Manufacturing Practice – GMP).

Kontrolę jakości wody oczyszczonej do bezpośredniego użycia należy również przeprowadzić po likwidacji każdej awarii urządzenia.

3. Oznaczenie przewodności

Oznaczyć przewodność właściwą w otrzymanej próbce wody stosując podane poniżej warunki:

Odczynniki, sprzęt, aparatura:

- ✓ badana próbka wody,
- ✓ naczynko pomiarowe,
- ✓ mieszadło magnetyczne i dipol,
- ✓ tryskawka z wodą destylowaną,
- ✓ konduktometr o rozdzielczości minimum $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$.

Wykonanie doświadczenia:

Należy zmierzyć przewodność właściwą bez kompensacji temperatury, lecz z jej jednoczesną rejestracją (pomiar z kompensacją temperatury może być wykonany po odpowiedniej walidacji – tego na ćwiczeniach nie wykonujemy).

- Do naczynka pomiarowego odmierzyć ok. 100-150 mL badanej próbki wody.
- W naczynku pomiarowym umieścić dipol magnetyczny (mieszadło magnetyczne).
- Ustawić naczynko pomiarowe na cokole mieszadła, włączyć mieszadło i ustawić obroty mieszania tak, aby dipol magnetyczny nie uderzał w ścianki naczynka pomiarowego.
- Zanurzyć w badanej próbce wody elektrodę wraz z czujnikiem temperatury. **UWAGA: elektrodę zanurzamy tak aby dipol nie dotykał elektrody ale żeby całe okienko pomiarowe elektrody było zanurzone w wodzie.**
- Po ustabilizowaniu na wyświetlaczu konduktometru wartości przewodności właściwej odczytać i zanotować w zeszycie (w protokole z wykonania analizy) wartość przewodności w $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ oraz temperaturę badanej próbki wody.
- Wyjąć elektrodę z badanej próby, zabezpieczyć przed osunięciem i dokładnie przepłukać wodą destylowaną z tryskawki (ostrożnie żeby nie zalać mieszadła i konduktometru). Umieścić elektrodę w naczyniu z wodą destylowaną i płukać aż do uzyskania przewodności poniżej $4 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.
- Wyjąć mieszadło, opłukać wodą destylowaną i odłożyć w wyznaczone miejsce do ponownego użycia.
- Zanotowane wartości porównać z danymi zamieszczonymi w Tabeli 1. Woda badana spełnia wymagania farmakopealne stawiane wodzie oczyszczonej, jeżeli zmierzona przewodność nie jest większa od wartości podanej w Tabeli 1 dla temperatury, w której wykonano badanie.
- Dla temperatury niepodanej w Tabeli 1 należy obliczyć wymaganą wartość przewodności ekstrapolując dane dla najbliższej niższej i najbliższej wyższej temperatury.
- Wyznaczoną wartość zanotować w zeszycie w „Protokole z wykonania analizy” w rubryce „Wymagania wg. FP XI”.

Temperatura (°C)	Przewodność właściwa ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
0	2,4
10	3,6
20	4,3
25	5,1
30	5,4
40	6,5
50	7,1
60	8,1
70	9,1
75	9,7
80	9,7
90	9,7
100	10,2

Tabela 1: Wymagania dla przewodności właściwej w zależności od temperatury

4. Oznaczanie zawartości substancji utleniających się

Zgodnie z FP XI, w ramach analizy właściwości fizykochemicznych wody destylowanej należy wykonać oznaczenie zawartości całkowitego węgla organicznego lub substancji utleniających się. W poniższym ćwiczeniu należy wykonać jedynie oznaczenie zawartości substancji utleniających się.

Odczynniki, sprzęt, aparatura:

- ✓ badana próbka wody,
- ✓ woda destylowana jako próba odniesienia,
- ✓ 2 duże próbówki szklane odpowiednio opisane,
- ✓ cylinder miarowy,
- ✓ pipeta automatyczna z końcówkami jednorazowymi,
- ✓ pipety Pasteura,
- ✓ rozcieńczony kwas siarkowy OD (OD-odczynnik),
- ✓ roztwór nadmanganianu potasu (0,02 mol/L) RM (RM - roztwór mianowany, o ściśle określonym stężeniu).

Wykonanie doświadczenia:

- Do opisanych probówek dodać: do jednej 10 mL badanej wody (**B**), a do drugiej 10 mL wody destylowanej (**O**), stanowiącej próbę odniesienia.
- Do obu probówek dodać pipetą automatyczną 1 mL rozcieńzonego kwasu siarkowego OD. Zawartość probówek delikatnie wymieszać.
- Do probówek dodać pipetą Pasteura po 1 kropli roztworu nadmanganianu potasu (0,02 mol/L) RM. Roztwór powinien zrobić się jasnoróżowy.
- Probówki umieścić w łaźni wodnej i utrzymywać 5 min we wrzeniu.
- Jeżeli woda spełnia wymagania farmakopealne dotyczące zawartości substancji utleniających się roztwór nie zmienia zabarwienia i pozostaje jasnoróżowy.
- Uzupełnić tabelę protokołu analizy w zeszycie.

5. Oznaczanie zawartości azotanów w analizie farmaceutycznej wody destylowanej

Odczynniki, sprzęt, aparatura:

- ✓ 2 duże próbówki opisane: próba badana (**B**) oraz próba odniesienia (**O**),
- ✓ 5 mL badanej wody oraz woda destylowana,
- ✓ cylinder miarowy,
- ✓ pipeta automatyczna z końcówkami jednorazowymi,
- ✓ pipety Pasteura,
- ✓ zlewka z zimną wodą i lodem
- ✓ 10% roztwór wodny chlorku potasu,
- ✓ roztwór difenyloaminy,
- ✓ stężony kwas siarkowy wolny od azotu,
- ✓ łaźnia wodna podgrzana do temp. 50°C,
- ✓ roztwór wzorcowy azotanów (2 µg NO₃⁻/mL).

Wykonanie doświadczenia:

- Przygotować w statywie 2 opisane próbówki: woda badana (**B**) oraz roztwór odniesienia (**O**).
- W próbówce (**O**) przygotować roztwór odniesienia. W tym celu do próbówki należy odmierzyć za pomocą cylindra miarowego 4,5 mL wody destylowanej (wolnej od azotanów) oraz pipetą automatyczną dodać 0,5 mL roztworu wzorcowego azotanów (2 µg NO₃⁻/mL). Do próbówki (**B**) odmierzyć 5mL wody badanej.
- Dodać do obu probówek pipetą automatyczną po 0,4 mL roztworu chlorku potasu oraz pipetą Pasteura 2 krople roztworu difenyloaminy (**WAŻNE: w próbie badanej i próbie odniesienia MUSI znaleźć się dokładnie tyle samo roztworu difenyloaminy**).
- Probówki w statywie przenieść do pokoju przygotowawczego, gdzie pod wyciągiem umieścić próbówki w zlewce z wodą z lodem.

- Następnie dodać do probówek po 5 mL stężonego kwasu siarkowego wolnego od azotu. Odmierzoną do małej probówki ilość kwasu siarkowego, ostrożnie dodawać małymi porcjami, cały czas lekko wstrząsając probówką.
- Zachowując szczególną ostrożność umieścić probówki w łaźni wodnej o temp. 50°C i ogrzewać 15 min.
- Po upływie czasu inkubacji wyjąć probówki z łaźni wodnej i porównać zabarwienie próbki badanej (**B**) z zabarwieniem roztworu odniesienia (**O**).
- Interpretacja wyniku analizy: jeśli niebieskie zabarwienie próbki badanej nie jest intensywniejsze niż zabarwienie roztworu odniesienia przygotowanego jednocześnie w takich samych warunkach, to zawartość azotanów jest nie większa niż 0,2µg/mL.
- Zgodnie z FP XI zawartość azotanów w wodzie destylowanej nie powinna być większa niż 0,2 µg/mL.
- Uzupełnić tabelę protokołu analizy w zeszycie.

6. Oznaczanie zawartości metali ciężkich

Zgodnie z FP XI do wykonania analizy wody oczyszczonej na zawartość metali ciężkich należy w szklanej parownicy odparować na łaźni wodnej 200 mL badanej wody do objętości 20 mL. Ze względu na ograniczony czas trwania ćwiczeń każdy Student otrzymuje w probówce Falcona ok. 50 mL uprzednio zagęszczonej wody badanej, z której należy wykonać analizę na zawartość metali ciężkich.

Odczynniki, sprzęt, aparatura:

- ✓ 3 duże probówki opisane: próba badana (**B**), próba odniesienia (**O**), próba ślepa (**Ś**),
- ✓ odparowana badana woda,
- ✓ woda destylowana,
- ✓ cylinder miarowy,
- ✓ pipeta automatyczna z końcówkami jednorazowymi,
- ✓ pipety Pasteura,
- ✓ łaźnia wodna podgrzana do temp. 90°C,
- ✓ roztwór wzorcowy ołowiu o stężeniu 1µg Pb/mL,
- ✓ roztwór buforowy octanu amonowego o pH=3,5,
- ✓ odczynnik tioacetamidowy (odczynnik w składzie zawiera AKT)

Wykonanie doświadczenia:

- W statywie w opisanych probówkach przygotować próbę badaną (**B**), odniesienia (**O**) i ślepa (**Ś**):
 - **Próba badana (B)**: 12 mL zagęszczonej wody badanej (**B**)
 - **Próba odniesienia (O)**: 10 mL wzorcowego roztworu ołowiu (1 µg Pb/mL) i 2 mL zagęszczonej wody badanej
 - **Próba ślepa (Ś)**: 10 mL wody destylowanej i 2 mL zagęszczonej wody badanej.
- Do każdej probówki dodać pipetą automatyczną po 2 mL (2x1mL) buforu octanu amonowego o pH=3,5. Zawartość probówek dokładnie wymieszać.
- Probówkę zawierającą odczynnik tioacetamidowy **odkrecić** i ostrożnie ogrzewać w gorącej łaźni wodnej, przez około 30 - 40 sekund (do pojawienia się charakterystycznego zapachu siarkowodoru uwalnianego z AKT).
- Do każdej próby (**B**, **O**, **Ś**) dodać pipetą automatyczną po 1 mL ogrzanego odczynnika tioacetamidowego. Próbki natychmiast, dokładnie wymieszać.
- Po około 2 minutach porównać na białym tle zawartość probówek. Jeśli w roztworze obecne są jony metali ciężkich pojawia się delikatny jasnobrunatny osad lub zabarwienie roztworu (czasami osad pojawia się dopiero po 5 minutach).
- Odczytanie wyniku analizy. Należy porównać zawartość próbki badanej z wyglądem roztworu odniesienia.
- **Uwaga:** w prawidłowo wykonanej analizie roztwór odniesienia nie powinien wykazywać obfitszego jasnobrunatnego osadu lub intensywniejszego zabarwienia w porównaniu z próbą ślepa (**Ś**).
- Interpretacja wyniku analizy. Jeśli jasnobrunatny osad/zabarwienie w roztworze badanym nie jest intensywniejsze niż osad w roztworze odniesienia, to zawartość metali ciężkich w badanej próbce wody jest nie większe niż 0,1µg/mL.
- Zgodnie z FP XI zawartość metali ciężkich w wodzie destylowanej nie powinna być większa niż 0,1 µg/mL.
- Uzupełnić tabelę protokołu analizy w zeszycie.

PROTOKÓŁ WYKONANIA ANALIZY FIZYKOCHEMICZNEJ WODY DESTYLOWANEJ

Data wykonania analizy:

Nazwa badania	Jednostka miary	Wymagania wg. FP XI*	Wynik analizy badanej próbki wody
Właściwości (wygląd)	X		
Przewodność			
Substancje utleniające się			
Azotany			
Metale ciężkie			

*Analizę wykonano zgodnie z Farmakopeą Polską XI, Warszawa 2017. FP XI (2017), Tom II, 01/2009:0008 i FP XI Supplement (2018), 04/2018:0008

Wniosek końcowy z wykonanej analizy farmakopealnej: