

Sól sodowa warfaryny

Oznaczanie w powietrzu środowiska pracy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej¹

Warfarin sodium.

Determining warfarin sodium in workplace air with high-performance liquid chromatography

dr MAŁGORZATA POŚNIAK
e-mail: mapos@ciop.pl
dr MAŁGORZATA SZEWCZYŃSKA
e-mail: mapol@ciop.pl
Centralny Instytut Ochrony Pracy –
Państwowy Instytut Badawczy
00-701 Warszawa
ul. Czerniakowska 16

Numer CAS: 129-06-6

Słowa kluczowe: sól sodowa warfaryny, analiza powietrza, stanowisko pracy, wysoko-sprawna chromatografia cieczowa.

Keywords: warfarin sodium, air analysis, workplace, high-performance liquid chromatography.

Streszczenie

Opracowano nową metodę oznaczania stężeń soli sodowej warfaryny (WAS) w powietrzu na stanowiskach pracy do przeprowadzania kontroli warunków sanitarnohigienicznych.

Metoda polega na: zatrzymaniu soli sodowej warfaryny na filtrze z włókna szklanego, wymyciu wodą destylowaną i analizie otrzymanego roztworu metodą wysokosprawnej chroma-

tografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną ($\lambda = 260$ nm).

Zakres metody wynosi $0,001 \div 0,087$ mg/m³ przy pobieraniu 480 l powietrza.

Opracowaną metodę oznaczania soli sodowej warfaryny w powietrzu na stanowiskach pracy zapisano w formie procedury analitycznej, którą zamieszczono w Załączniku.

¹ Publikacja przygotowana na podstawie wyników badań wykonanych w ramach zadania nr 01.A.03 programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy” (II etap) dofinansowanego w latach 2011-2013 w zakresie służb państwowych przez Ministerstwo Pracy i Polityki Społecznej. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

Summary

A new procedure aiming at controlling working conditions has been developed for the measurement of warfarin sodium in the workplaces air.

The method is based on adsorption of WAS on glass fiber filter, elution by water and analysis using high-performance liquid chromatography with a UV detector ($\lambda = 260$ nm).

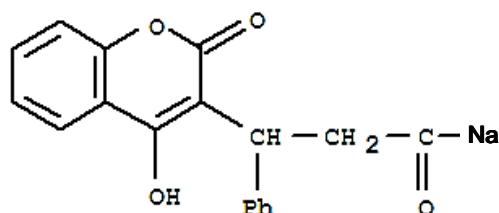
The working range of the analytical method is from 0,001 to 0,087 mg/m³ for 480 l air sample.

The developed method of determining warfarin sodium in the workplaces air has been recorded as an analytical procedure, which is available in the Appendix.

WPROWADZENIE

Sól sodowa warfaryny (sól sodowa 3-(1-fenyl-3-oksobutylo)-4-hydroksykumaryny, WAS) jest substancją czynną farmakologicznie z grupy antykoagulantów, stosowaną do produkcji leków zapobiegających: zakrzepicy żył głębokich, zatorowości płucnej, zawałowi mięśnia serco-

wego i powikłaniom zakrzepowo-zwrotnym u pacjentów z migotaniem przedsionków, z patologią zastawek lub po ich protezowaniu (rys. 1.). Mechanizm działania tej substancji polega na obniżeniu krzepliwości krwi przez zapobieganie produkcji protrombiny.



Rys. 1. Wzór strukturalny soli sodowej warfaryny (WAS)

Sól sodowa warfaryny jest również wykorzystywana do produkcji rodentycydów zwalczających gryzonie. Jest ona dopuszczona do stosowania do produkcji tych preparatów obwieszczeniem ministra zdrowia w sprawie wykazu substancji czynnych dozwolonych do stosowania w produktach biobójczych (MP 2010 r., nr 79, poz. 973).

Pomimo że sól sodowa warfaryny jest substancją odpowiedzialną za działanie lecznicze, to może stanowić zagrożenie dla zdrowia pracowników na etapie: syntezy substancji farmakologicznie czynnych, przy przygotowaniu mieszanek, produkcji odpowiednich postaci leków, konfekcjonowaniu oraz pakowaniu wyprodukowanych leków. Praca w

warunkach narażenia na tę substancję może być przyczyną: wydłużenie czasu krzepnięcia krwi, tworzenia nieprawidłowych krwinek oraz zmian w szpiku kostnym. Mogą również występować: krwawienia z nosa i dziąseł oraz samoistne siniaki i wybroczyny. Sól sodowa warfaryny została sklasyfikowana przez producentów jako substancja bardzo toksyczna wg zasad podanych w rozporządzeniu WE nr 1271/2008 i dyrektywie 67/548/EWG. Szczegółowe dane podane w kartach charakterystyk dotyczące klasyfikacji i oznakowania zamieszczono w tabeli 1. oraz na rysunku 2. (Dz. Urz. WE L 353/2 ze zm.; Karta charakterystyki TOXAN®-W; FREGATA S.A).

Tabela 1.

Klasyfikacja oraz oznakowanie soli sodowej warfaryny (WAS)

Klasyfikacja		Oznakowanie	
dyrektywa 67/548/EWG	rozporządzenie 1272/2008	dyrektywa 67/548/EWG	rozporządzenie 1272/2008
Działa bardzo toksycznie po połknięciu; może działać szkodliwie na dziecko w łonie matki	toksyczność ostra, doustnie kat. 2., szkodliwie działa na rozrodczość kat. 1.B	zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia: – R61 – może działać szkodliwie na dziecko w łonie matki – R28 – działa bardzo toksycznie również po połknięciu – R48/22 – działa szkodliwie po połknięciu; stwarza poważne zagrożenie zdrowia w następstwie długotrwałego narażenia zwroty określające środki ostrożności: – S53 – unikać narażenia – przed użyciem zapoznać się z instrukcją – S28 – zanieczyszczoną skórę natychmiast przemyć wodą – S36/37 – nosić odpowiednią odzież ochronną i odpowiednie rękawice ochronne – S45 – w przypadku awarii lub jeżeli źle się poczujesz, niezwłocznie zasięgnij porady lekarza – jeżeli to możliwe, pokaż etykietę	zwroty określające rodzaj zagrożenia: – H300 – połknięcie grozi śmiercią – H360 – może działać szkodliwie na płodność lub na dziecko w łonie matki – H372 – powoduje uszkodzenie narządów (podać wszystkie znane narządy, których to dotyczy) przez długotrwałe lub powtarzane narażenie (podać drogę narażenia, jeżeli udowodniono, że inne drogi narażenia nie stwarzają zagrożenia) zwroty określające środki ostrożności: – P201 – przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności – P264 – dokładnie umyć ręce po manipulowaniu – P301+P310 – w przypadku połknięcia, natychmiast skontaktować się z ośrodkiem zatruc lub lekarzem – P308+P313 – w przypadku narażenia lub styczości, zasięgnąć porady/zgłosić się do lekarza

Dyrektywa 67/548/EWG



CLP



GHS 06

GHS 08

GHS 09

Rys. 2. Piktogramy soli sodowej warfaryny (WAS)

Dla soli sodowej warfaryny, podobnie jak dla większości farmakologicznie czynnych substancji stosowanych do produkcji leków, nie ma ustalonych wartości najwyższych do-

puszczalnych stężeń w krajowym ustawodawstwie (DzU 2002 nr 217, poz. 1833, ze zm.) i w dyrektywach europejskich (Dz. Urz. WE L 142; Dz. Urz. WE L 38; Dz. Urz. WE L 338),

jak również nie zostały te wartości ustalone przez Higienistów Amerykańskich (ACGIH 2012). Nie znaleziono również tych wartości w dostępnych kartach charakterystyk opracowanych przez producentów tej substancji. W przypadku braku takich wartości dla substancji farmaceutycznych można do celów oceny narażenia zawodowego ustalać wartości dopuszczalnych stężeń w powietrzu na stanowiskach pracy, korzystając z kryteriów zaproponowanych przez: Międzynarodową Grupę Techniczną (IPCS – International Program on Chemical Safety), NIOSH czy OSHA.

Według danych z zakładów farmaceutycznych, podstawą oceny narażenia zawodowego na różnych etapach produkcji leków, w których skład wchodzi sól sodowa warfaryny, jest pomiar stężenia pyłu całkowitego i odniesienie wyników pomiarów do wartości NDS (10 mg/m^3) dla nietoksycznych pyłów przemysłowych. Takie jednak postępowanie w przypadku substancji farmakologicznie czynnych, sklasyfikowanych jako niebezpieczne substancje chemiczne, jest nieprawidłowe i nie pozwala na prawidłowe zarządzanie ryzykiem zawodowym stwarzanym przez te sub-

stancje na różnych etapach produkcji leku. W dostępnym piśmiennictwie nie ma także metody oznaczania soli sodowej warfaryny w powietrzu na stanowiskach pracy przeznaczonej do oceny warunków sanitarnohigienicznych.

Korzystając z danych piśmiennictwa (IACP 2003; DzU 2012 r., nr 1018, poz. 108; CCOHA 2006; DzU 2006 r., nr 101, poz. 697; *Van Arnum* 2006; *Eherts* 2004; *Pośniak, Galwas* 2008; *Pośniak, Bartoszek* 2009), a także na podstawie danych dotyczących toksycznego działania, zaklasyfikowano sól sodową warfaryny do odpowiednich grup toksyczności i zaproponowano referencyjną wartość dopuszczalnego stężenia w powietrzu na stanowiskach pracy na poziomie $0,01 \text{ mg/m}^3$, którą można zastosować jako kryterium do oceny narażenia zawodowego. Zebrane dane, będące podstawą zaproponowanej wartości, podano w tabeli 2. Opracowano również metodę oznaczania stężeń soli sodowej warfaryny w powietrzu na stanowiskach pracy na podstawie przeprowadzonych badań eksperymentalnych, których wyniki przedstawiono w niniejszym artykule.

Tabela 2.

Dane do ustalenia referencyjnej wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) soli sodowej warfaryny (WAS) w powietrzu na stanowiskach pracy

Substancja czynna	WAS nr CAS 129-06-6
Nazwa leku/kod ATC	warfarin 2,5 mg/B 01 AA 03 B – krew i układ krwiotwórczy B 01 – leki przeciwzakrzepowe B 01 AA 03 – antagoniści witaminy K
Klasa toksyczności wg rozporządzenia ministra zdrowia (DzU 2012, nr 1018, poz. 108)	bardzo toksyczna na podstawie wartości LD_{50} podanie do żołądka szczura $LD_{50} - 1,6 \text{ mg/kg}$ $LD_{50} - 8,7 \text{ mg/kg}$ naniesienie na skórę szczura $LD_{50} - 40 \text{ mg/kg}$
Klasa toksyczności wg CLP (Dz. Urz. WE L 353/2; ze zm.)	kategoria 1.– na podstawie wartości LD_{50} podanie do żołądka szczura $LD_{50} - 1,6 \text{ mg/kg}$ naniesienie na skórę szczura $LD_{50} - 40 \text{ mg/kg}$
Klasa toksyczności według Hodge'a i Sternera (CCOHA 2006)	bardzo toksyczna – na podstawie wartości LD_{50} podanie do żołądka i na skórę szczura
Klasyfikacja wg wykazu leków (DzU 2006, nr 101, poz. 697)	substancja czynna silnie działająca

cd. tab. 2.

Substancja czynna	WAS nr CAS 129-06-6
Kategorie toksyczności substancji czynnych (<i>Van Arnum</i> 2006)	kategoria toksyczności 3. – niebezpieczne substancje proponowana wartość dopuszczalnego stężenia w powietrzu na stanowiskach pracy w zakresie $30 \text{ ng/m}^3 \div 10 \text{ }\mu\text{g/m}^3$
Relatywna toksyczność substancji farmakologicznie czynnych (<i>Eherts</i> 2004)	kategoria toksyczności IV – szczególnie toksyczne, mogą działać żrąco, uczulająco lub genotoksycznie i/lub mają bardzo dużą aktywność farmakologiczną proponowana wartość dopuszczalnego stężenia w powietrzu na stanowiskach pracy w zakresie $1 \div 0 \text{ }\mu\text{g/m}^3$
Działania niepożądane	bardzo toksyczny po podaniu przez drogi oddechowe, w kontakcie ze skórą i po spożyciu; substancja działająca na rozrodczość; działa drażniąco na oczy; potwierdzone działanie teratogenne na ludziach; wydłużenie czasu krzepnięcia krwi; tworzenie nieprawidłowych krwinek; zmiany szpiku kostnego; krwawienie z nosa, dziąseł; samoistne tworzenie się siniaków i wybroczyn; może powodować osteoporozę
Referencyjna wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia do celów oceny narażenia zawodowego	$0,01 \text{ mg/m}^3$ ($10 \text{ }\mu\text{g/m}^3$)

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Podczas badań nad: ustaleniem parametrów wyodrębniania soli sodowej warfaryny z powietrza, przygotowaniem pobranej próbki powietrza do analizy i ilościowym oznaczaniu badanej substancji, zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową z detekcją spektrofotometryczną.

W badaniach zastosowano:

- wysokosprawny chromatograf cieczowy firmy Elite LaChrom Merck-Hitachi, wyposażony w: pompę binarną, termostat, detektor spektrofotometryczny DAD firmy Elite LaChrom Merck-Hitachi, automatyczny dozownik próbek oraz komputer z programem sterowania i zbierania danych
- kolumnę Lichrospher CN o długości 25 cm i średnicy wewnętrznej 4,6 mm wypełnioną żelem krzemionkowym, modyfikowanym funkcyjnymi grupami cyjanopropylowymi (Agilent Technologies, USA)
- aspiratory Gilair 5 (Sensidine, USA) o zakresie pracy $0,75 \div 5 \text{ l/min}$

- wytrząsarkę mechaniczną WL-2000 (JWElectronik, Polska)
- wagę analityczną Sartorius TE214S (Sartorius Corporation, USA).

W badaniach stosowano:

- sól sodową warfaryny (Aldrich), kwas octowy (Aldrich), acetonitryl (Aldrich), wodę o czystości do HPLC (Millipore Q-Plus)
- filtry z włókna szklanego o średnicy 37 mm (Supelco) do pobierania próbek powietrza
- mikrostrzykawki do cieczy (Supelco)
- szkło laboratoryjne.

Warunki oznaczania chromatograficznego

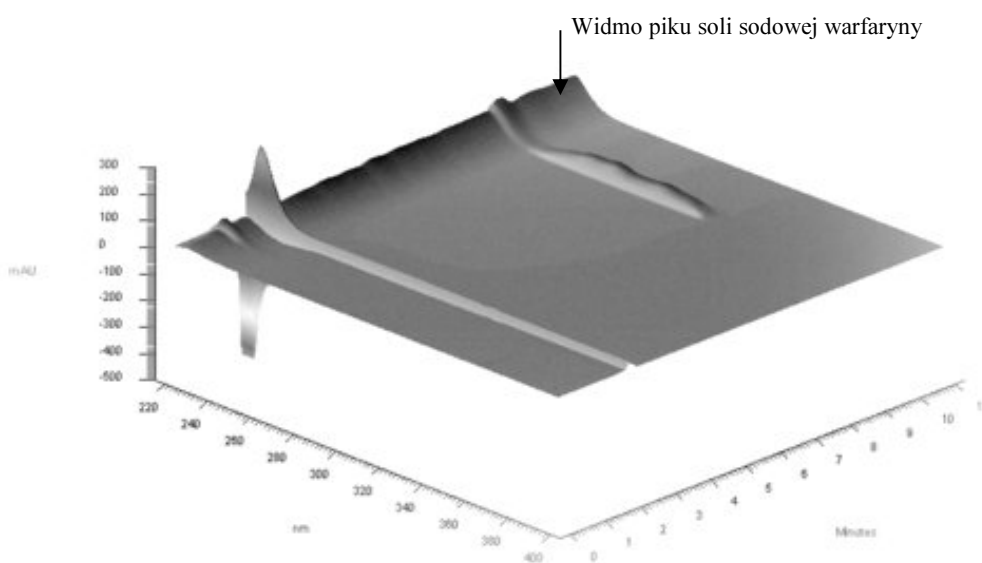
Na podstawie wyników przeprowadzonych badań ustalono, że zastosowanie: kolumny polarnej o właściwościach hydrofobowych z żelem krzemionkowym o granulacji $5\mu\text{m}$ i wielkość porów 100 Å (10 nm), modyfikowa-

nym funkcyjnymi grupami cyjanopropylowymi oraz mieszaniny: kwasu octowego, wody i acetonitrylu jako fazy ruchomej, umożliwia oznaczania soli sodowej warfaryny na poziomie 0,020 mg/ml.

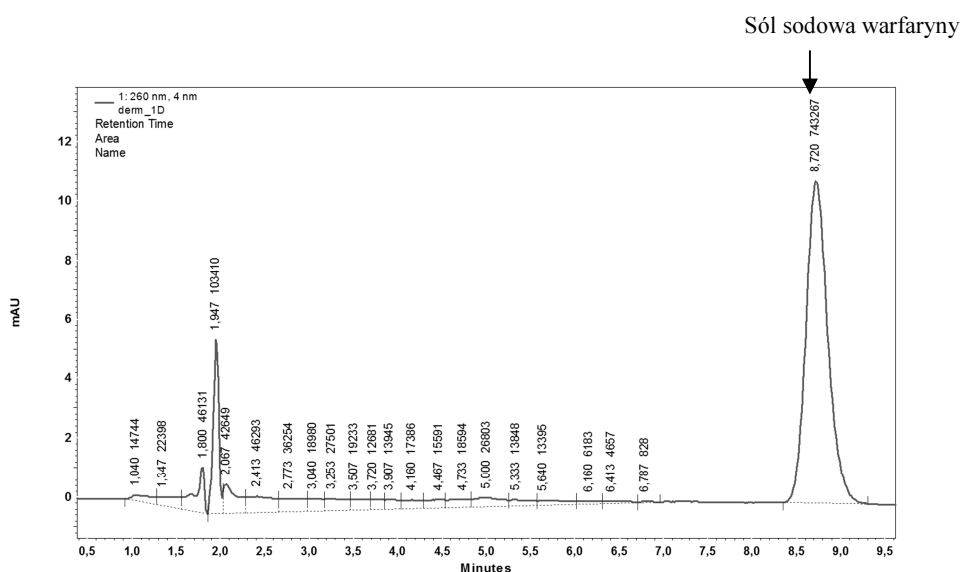
Badanie dotyczące wyboru długości fali analitycznej wykonano z wykorzystaniem detektora diodowego, analizując widmo soli sodowej warfaryny w zakresie 200 ÷ 400 nm. Analiza widma UV badanej substancji wskazuje, że najbardziej odpowiednią do oznaczeń

ilościowych długością fali analitycznej jest $\lambda = 260$ nm (rys. 3).

Rozdział badanej substancji od substancji współwystępujących w procesie produkcji leku uzyskano, stosując fazę ruchomą o składzie kwas octowy/acetonitryl/woda destylowana w proporcji: 1: 25: 74 (v/v) i przepływie 1,5 ml/min w temperaturze kolumny 30 °C. Chromatogram próbki powietrza pobranej podczas tabletkowania leku przedstawiono na rysunku 4.



Rys. 3. Widmo soli sodowej warfaryny (WAS) w zakresie 200 ÷ 350 nm



Rys. 4. Chromatogram roztworu próbki powietrza pobranej na stanowisku tabletkowania leku zawierającego sól sodową warfaryny (WAS)

Ustalenie warunków pobierania próbek powietrza i wyznaczenie współczynnika odzysku

Sól sodowa warfaryny z uwagi na właściwości fizykochemiczne – temperaturę topnienia (161 °C) i prężność par (0,16 kPa) w temperaturze 106 °C – jest emitowana w postaci aerozolu do powietrza stanowisk pracy w procesie produkcji leków i preparatów biobójczych. Z tego względu do oceny narażenia zawodowego w przypadku tej substancji należy oznaczać jej zawartość we frakcji wdychalnej aerozolu, wyodrębnionej z badanego powietrza na odpowiednio dobranych filtrach.

Do badań wybrano filtry z włókna szklanego, powszechnie stosowane podczas pobierania próbek powietrza zawierającego aerozole substancji organicznych. Do wymywania soli sodowej warfaryny z filtrów zastosowano wodę destylowaną, ponieważ substancja ta jest dobrze rozpuszczalna w wodzie.

W celu zbadania odzysku soli sodowej warfaryny z filtrów z włókna szklanego przygotowano w kolbach Erlenmayera trzy serie pomiarowe po sześć filtrów każda. Na filtry nano-

szono po 100 µl roztworów soli sodowej warfaryny o stężeniach: 0,02; 0,12 i 0,24 mg/ml. Po wysuszeniu filtrów, dodawano do każdej kolby po 3 ml wody destylowanej i przeprowadzono wymywanie, wytrząsając zawartość kolb przez 30 min na wytrząsarce mechanicznej. Przygotowano trzy próby kontrolne zawierające czyste filtry. Część roztworów z nad filtrów przenoszono do szklanych naczynek o pojemności 1 ml i poddawano analizie chromatograficznej w ustalonych warunkach. Jednocześnie wykonano analizę roztworów wzorcowych otrzymanych przez wprowadzenie po 100 µl roztworów soli sodowej warfaryny o stężeniach: 0,02; 0,12 oraz 0,24 mg/ml do kolb Erlenmayera zawierających po 3 ml wody destylowanej. Na podstawie wyników badania odzysku soli sodowej warfaryny z filtrów z włókna szklanego, przedstawionych w tabeli 3., wykazano, że woda destylowana jest dobrym eluentem badanej substancji z filtrów z włókna szklanego. Wartości odzysku soli sodowej warfaryny z filtrów dla trzech analizowanych stężeń wynoszą odpowiednio: 105; 103 i 85%. Średnia wartość współczynnika odzysku wynosi 95%.

Tabela 3.

Badanie odzysku soli sodowej warfaryny (WAS) z filtrów z włókna szklanego

	Powierzchnia pików z roztworów po desorpcji wg wskazań analitycznej stacji komputerowej	Średnia powierzchnia pików z roztworów po desorpcji, P_i	Średnia powierzchnia pików z roztworów porównawczych, P_o	Współczynnik desorpcji, d	Średni współczynnik desorpcji, d_{sr}
Sól sodowa warfaryny – 0,6 µg					
1	47 116,0 45 888,0	46 502,0		1,05	
2	45 690,0 43 482,0	44 586,0		1,01	
3	46 967,0 45 858,0	46 412,5	44 118,50	1,05	1,05
4	47 181,0 46 451,0	46 816,0		1,06	
5	46 322,0 46 793,0	46 557,5		1,06	

cd. tab. 3.

Powierzchnia pików z roztworów po desorpcji wg wskazań analitycznej stacji komputerowej		Średnia powierzchnia pików z roztworów po desorpcji, P_i	Średnia powierzchnia pików z roztworów porównawczych, P_o	Współczynnik desorpcji, d	Średni współczynnik desorpcji, d_{sr}
6	46 322,0 46 793,0	46 557,5		1,06	
Średnia powierzchnia pików					46 238,6
Odchylenie standardowe, S					1 001,4
Współczynnik zmienności, V (%)					2,17
Sól sodowa warfaryny – 1,2 μg					
89824		89 892,5		1,02	
89961					
88644		88 196,0		1,00	
87748					
90208		88 687,0		1,01	
87166			88 022,50		1,02
90939		90 473,5		1,03	
90008					
91470		90 593,5		1,03	
89717					
91470		90 593,5		1,03	
89717					
Średnia powierzchnia pików					89 739,3
Odchylenie standardowe, S					1 333,7
Współczynnik zmienności, V (%)					1,49
Sól sodowa warfaryny – 2,4 μg					
173862		176 603,0		0,85	
179344					
178649		176 236,0		0,85	
173823					
174846		174 669,5		0,84	
174493			207 184,50		0,85
175133		173 245,5		0,84	
171358					
174724		175 126,5		0,85	
175529					
174724		175 126,5		0,85	
175529					
Średnia powierzchnia pików					175 167,8
Odchylenie standardowe, S					2 106,3
Współczynnik zmienności, V (%)					1,20

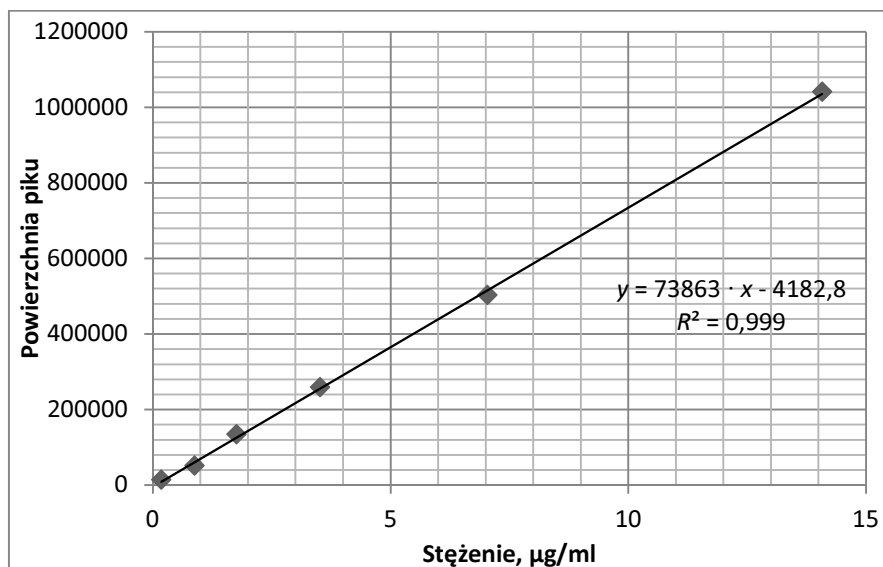
Kalibracja i precyzja

W celu określenia zakresu roboczego i zakresu liniowości metody wykonano trzy serie badań roztworów wzorcowych soli sodowej warfaryny o stężeniach: 0,17; 0,88; 1,76; 3,52;

7,04 oraz 14,08 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Wyniki badania zakresu liniowości metody przedstawiono graficznie na rysunku 5. i w tabeli 4.

Z przedstawionych danych wynika, że zależność odpowiedzi detektora od stężenia soli sodowej warfaryny ma charakter liniowy

w badanym zakresie stężeń. Zależność tę opisuje równanie: $y = 73862,55 \cdot x - 4182,75$, a współczynnik korelacji „ R ” jest równy 0,999.



Rys. 5. Wykres zależności powierzchni pików od stężenia soli sodowej warfaryny (WAS). Kolumna Lichrospher 100 CN, faza ruchoma, kwas octowy: woda: acetonitryl

Tabela 4.
Wyniki badania precyzji oznaczeń kalibracyjnych

Stężenie (x), µg/ml	Średnia powierzchnia pików (y_{sr}) wg wskazań analitycznej stacji komputerowej			Średnia powierzchnia z serii I-III, $y_{sr.I-III}$	Odchylenie standar- dowe, S	Współ- czynnik zmienno- ści, V, % $V = (S/y_{sr.I-III})100\%$	Współ- czynnik kalibracji, B $f(c) = y/x$
	I seria	II seria	III seria				
0,16	14438	14896	14249	14527,67	332,69	2,29	82543,58
0,88	50057	51645	51386	51029,33	851,96	1,67	57987,88
1,76	138187	136601	129472	134753,33	4 642,00	3,44	76564,39
3,52	260258	256198	259752	258736	2 212,49	0,86	73504,55
7,04	518974	493652	495943	502856,33	14 005,23	2,79	71428,46
14,08	1033900	1066233	1022780	1040971	22 572,99	2,17	73932,6
Krzywa kalibracji $Y = B \cdot x + A$	$y = 73611,39 \cdot x - 876,7$	$y = 75386,36 \cdot x - 8430,51$	$y = 72589,9 \cdot x - 3241,05$	$y = 73862,55 \cdot x - 4182,75$			
Współczynnik korelacji, R	0,9998	0,9992	0,9998	0,9997			

Walidacja

Walidację metody przeprowadzono zgodnie z wytycznymi zawartymi w normie PN-EN 482:2012 i opracowaniu *Dobeckiego* (PN-EN 482:2012; *Dobecki* 2004). Wyznaczone

parametry walidacyjne przedstawione w tabeli 5. potwierdzają przydatność nowo opracowanej metody oznaczania soli sodowej warfaryny do oznaczania stężeń tej substancji chemicznej w powietrzu na stanowiskach pracy.

Tabela 5.

Dane walidacyjne metody oznaczania soli sodowej warfaryny (WAS)

Walidowane parametry	Wartość
Zakres pomiarowy	0,16 ÷ 14,0 µg/ml (0,001 ÷ 0,087 mg/m ³)
Granica wykrywalności (LOD), x_{gw}	0,015 µg/ml
Granica oznaczania ilościowego (LOQ), x_{ozn}	0,046 µg/ml
Współczynnik korelacji, R	0,9998
Całkowita precyzja badania, V_c	6,753
Niepewność całkowita metody, U_T , %	14,351
Niepewność rozszerzona, U , %	28,702

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano selektywną metodę oznaczania soli sodowej warfaryny w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (UV).

W metodzie do pobierania próbek powietrza zastosowano filtry z włókna szklanego, z których sól sodową warfaryny wymywano wodą destylowaną. Do oznaczania wytypowano kolumnę Lichrospher CN eluowaną mieszaniną: kwasu octowego, wody i acetonitrylu w proporcji: 1: 25: 74, co pozwala na selektywne oznaczanie soli sodowej warfaryny w obecności innych substancji występujących w powietrzu na różnych etapach produkcji leku.

Opracowana metoda oznaczania stężeń soli sodowej warfaryny może być wykorzystywana przez laboratoria higieny pracy do wykonywania pomiarów stężeń tej substancji w powietrzu na stanowiskach pracy, w celu oceny narażenia pracowników oraz oceny ryzyka zawodowego stwarzanego przez tę substancję. Wyniki tej oceny będą stanowiły podstawę do podejmowania odpowiednich działań profilaktycznych.

Opracowaną metodę oznaczania soli sodowej warfaryny w powietrzu na stanowiskach pracy zapisano w formie procedury analitycznej, którą zamieszczono w Załączniku.

PIŚMIENNICTWO

CCOHA (2006) Toxicity glasses. Hodge and sterner scale. Canadian Centre for Occupational Health and Safety [http://www.ccohs.ca/].

Dobecki M. (2004) Zapewnienie jakości analiz chemicznych. Wyd. 3. popraw. Łódź, Instytut Medycyny Pracy.

Dyrektywa Komisji 2000/39/WE z dnia 8.06.2000 r. ustanawiająca pierwszą listę indykatorywnych wartości granicznych narażenia na czynniki zewnętrzne podczas pracy w związku z wykonaniem dyrektywy Rady 98/24/EWG w sprawie ochrony zdrowia i bezpieczeństwa pracowników przed ryzykiem związanym z czynnikami chemicznymi w miejscu pracy. Dz. Urz. WE L 142 z dnia 16.06.2000, 432.

Dyrektywa Komisji 2006/15/WE z dnia 7.02.2006 r. ustanawiająca drugi wykaz indykatorywnych dopuszczalnych wartości narażenia zawodowego w celu wykonania dyrektywy Rady 98/24/WE oraz zmieniająca dyrektywę 91/322/EWG i 2000/39/WE. Dz. Urz. WE L 38 z dnia 9.02.2006, 36.

Dyrektywa Komisji 2009/161/WE z dnia 17.12.2009 r. ustanawiająca trzeci wykaz wskaźnikowych dopuszczalnych wartości narażenia zawodowego w celu wykonania dyrektywy Rady 98/24/WE oraz zmieniająca dyrektywę Komisji 2000/39/WE. Dz. Urz. WE L 338 z dnia 19.12.2009, 87.

Dyrektywa Rady z dnia 27.06. 1967 r. w sprawie zbliżenia przepisów ustawodawczych, wykonawczych i administracyjnych odnoszących się do klasyfikacji,

- pakowania i etykietowania substancji niebezpiecznych. Dz.Urz. WE. 196, 16/08/1967, P. 0001 – 0098.
- Eherts D.* (2004) Control banding from the pharma perspective. Staying ahead of the regulation. Society of Chemical Hazard Communication, SCHC FALL 2004 MEETING, October 26–27, Arlington, VA.
- IACP (2003) Hazard alert. Compounding with hazardous and/or potent pharmaceuticals. International Academy of Compounding Pharmacists.
- Karta charakterystyki 3-(β-Acetylofenyl)-4-hydroxycoumarin sodium. Sigma-Aldrich.
- Karta charakterystyki TOXAN®-W, FREGATA S.A. [http://www.fregata.gda.pl/uploads/fck/file/KC%2014_11_12/SDS%20TOXAN%20-%20W%20-%202011_2012.pdf].
- Obwieszczenie ministra zdrowia z dnia 22.10.2010 r. w sprawie wykazu substancji czynnych dozwolonych do stosowania w produktach biobójczych oraz produktach biobójczych niskiego ryzyka. MP 2010, nr 79, poz. 973.
- PN-EN 482:2012 Powietrze na stanowiskach pracy – Wymagania ogólne dotyczące charakterystyki procedur pomiarów czynników chemicznych. European Committee for Standardization. Centralny Sekretariat: rue de Stassart, 36B-1050 Bruksela.
- Pośniak M., Galwas M.* (2008) Substancje farmakologicznie czynne – ocena i ograniczanie ryzyka zawodowego. *Przemysł Farmaceutyczny* 2, 61–65.
- Pośniak M., Bartoszek D.* (2009) Analiza i ocena zagrożeń chemicznych w procesie produkcji leków. Warszawa, CIOP-PIB.
- Rozporządzenie ministra pracy i polityki społecznej z dnia 29.11.2002 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń substancji szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy. Dz.U nr 217 poz. 1833; ze zm.
- Rozporządzenie ministra zdrowia z dnia 10.08.2012 r. w sprawie kryteriów i sposobu klasyfikacji substancji chemicznych i ich mieszanin. Dz.U nr 1018, poz. 108.
- Rozporządzenie ministra zdrowia z dnia 13.06.2006 r. Wykaz leków podstawowych i uzupełniających oraz wysokość odpłatności za leki uzupełniające. Dz.U nr 101, poz. 697.
- Rozporządzenie ministra zdrowia z dnia 20.04.2012 r. w sprawie oznakowania opakowań substancji niebezpiecznych i mieszanin niebezpiecznych oraz niektórych mieszanin. Dz.U 2012, poz. 445.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16.12.2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (CLP), zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006. Dz. Urz. WE L 353/2 z dnia 31.12.2008; ze zm.
- Threshold limit values for chemical substances and physical agents (2012) Biological exposure indices. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), Cincinnati OH.
- Van Arnum P.* (2006) Contract manufacturing Organizations Expand in High-Potency manufacturing. *Pharm. Technol.* 9, 10.

PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA SOLI SODOWEJ WARFARYNY

1. Zakres procedury

W niniejszej procedurze analitycznej podano metodę oznaczania zawartości soli sodowej warfaryny (WAS) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną.

Najmniejsze stężenie soli sodowej warfaryny, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w procedurze, wynosi $0,001 \text{ mg/m}^3$.

2. Norma powołana

PN-Z-04008-7:2002/Az1: 2004 Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek – Zasady pobierania próbek powietrza w środowisku pracy i interpretacji wyników.

3. Zasada metody

Metoda polega na zatrzymaniu aerozolu soli sodowej warfaryny na filtrze z włókna szklanego, wymywaniu analitu wodą destylowaną i analizie chromatograficznej otrzymanego roztworu.

4. Wytyczne ogólne

4.1. Czystość odczynników

Podczas analizy, jeżeli nie zaznaczono inaczej, należy stosować odczynniki o stopniu czystości co najmniej cz.d.a.

4.2. Dokładność ważenia

Substancje stosowane w analizie należy ważyć z dokładnością do $0,0002 \text{ g}$.

4.3. Postępowanie z substancjami niebezpiecznymi

Czynności związane z solą sodową warfaryny należy wykonywać pod sprawnie działającym wyciągiem. Zużyte roztwory i odczynniki należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do utylizacji uprawnionym do tego instytucjom.

5. Odczynniki, roztwory i materiały

5.1. Sól sodowa warfaryny

Stosować jako substancję wzorcową sól sodową warfaryny wg pkt. 4.1.

5.2. Kwas octowy

Stosować lodowaty kwas octowy wg pkt. 4.1.

5.3. Acetonitryl

Stosować acetonitryl wg pkt. 4.1.

5.4. Woda destylowana

Stosować wodę destylowaną o czystości do HPLC.

5.5. Roztwór wzorcowy podstawowy

Do zważonej kolby pomiarowej o pojemności 50 ml należy odważyć około 8 mg soli sodowej warfaryny wg pkt. 5.1., kolbę zważyć, uzupełnić do kreski wodą destylowaną wg punktu 5.4. i dokładnie wymieszać. Stężenie soli sodowej warfaryny w tak przygotowanym roztworze wynosi około $160 \mu\text{g/ml}$. Obliczyć dokładną zawartość tego związku w 1 ml roztworu.

5.6. Roztwór wzorcowy pośredni

Do kolby pomiarowej o pojemności 25 ml odmierzyć 2,5 ml roztworu wzorcowego podstawowego wg pkt. 5.5. i uzupełnić wodą destylowaną wg pkt. 5.4 do kreski. Stężenie w tak przygotowanym roztworze wynosi około $16 \mu\text{g/ml}$. Obliczyć dokładną zawartość tego związku w 1 ml roztworu.

5.7. Roztwory wzorcowe robocze

Do sześciu kolb pomiarowych o pojemności 10 ml odmierzyć kolejno: 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 i 8 ml roztworu wzorcowego pośredniego wg pkt. 5.6., uzupełnić do kreski wodą destylowaną wg pkt. 5.4 i wymieszać. Obliczyć zawartość soli sodowej warfaryny w 1 ml tak przygotowanych roztworów.

5.8. Roztwór do wyznaczania współczynnika odzysku

Do zważonej kolby pomiarowej o pojemności 10 ml odmierzyć 4,5 ml roztworu wzorcowego podstawowego wg pkt. 5.5., uzupełnić do kreski wodą destylowaną wg pkt. 5.4. i dokładnie wymieszać. Stężenie soli sodowej warfaryny w tak przygotowanym roztworze wynosi około 72 µg/ml. Obliczyć dokładnie zawartość tego związku w 1 ml roztworu.

Roztwory przygotowane wg pkt.pkt. 5.5 ÷ 5.8. przechowywane w chłodziarce są trwałe przez siedem dni.

5.9. Filtry z włókna szklanego

Do pobierania próbek powietrza stosować filtry włókna szklanego o średnicy 37 mm lub inne równoważne.

Czystość stosowanych filtrów należy zbadać chromatograficznie oraz wyznaczyć współczynnik odzysku soli sodowej warfaryny wg pkt. 11.

Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

6.1. Chromatograf cieczowy

Stosować chromatograf cieczowy z detektorem spektrofotometrycznym DAD i pętlą dozowniczą o pojemności 20 µl oraz elektronicznym integratorem.

6.2. Kolumna chromatograficzna

Stosować kolumnę chromatograficzną umożliwiającą rozdział soli sodowej warfaryny od innych substancji występujących jednocześnie w badanym powietrzu, np.: kolumnę stalową o długości 25 cm i średnicy wewnętrznej 4,6 mm, z żelem krzemionkowym o uziarnieniu 5 µm i wielkości porów 10 nm, modyfikowanym grupami cyjanopropylowymi.

6.3. Mikrostrzykawki

Stosować mikrostrzykawki do cieczy o pojemności: 100; 500 i 1000 µl.

6.4. Kolby Erlenmayera do wmywania

Stosować kolby Erlenmayera o pojemności około 25 ml z korkami zapewniającymi szczelne zamknięcie kolb.

6.5. Pompa ssąca

Stosować pompę ssącą umożliwiającą pobieranie próbek powietrza ze stałym strumieniem objętości wg pkt. 7.

6.6. Kolby pomiarowe

Stosować kolby szklane o pojemności: 10; 25 i 50 ml.

6.7. Pipeta szklana

Stosować pipetę do cieczy o pojemności 5 ml.

6.8. Wytrząsarka

Stosować wytrząsarkę mechaniczną.

6.9. Nasadki filtracyjne

Do filtrowania analizowanych roztworów stosować nasadkę filtracyjną z filtrem z włókna szklanego o średnicy porów 0,45 µm.

7. Pobieranie próbek powietrza

Próbki powietrza należy pobierać zgodnie z zasadami zawartymi w normie PN-Z-04008-7:2002/Az1: 2004.

W miejscu pobierania próbek przez filtr szklany wg pkt. 5.9. przepuścić 480 l badanego powietrza ze stałym strumieniem objętości, nie większym niż 2 l/min. Pobrane próbki przechowywane w lodówce są trwałe czternaście dni.

8. Warunki pracy chromatografu

Należy tak dobrać warunki pracy chromatografu, aby uzyskać rozdział soli sodowej warfaryny od substancji współwystępujących. W przypadku stosowania kolumny o parametrach wg pkt. 6.2., oznaczanie można wykonać w następujących warunkach:

– faza ruchoma	kwasy octowy/acetonytryl/woda destylowana 1: 25: 74 (v/v)
– przepływ fazy ruchomej	1,5 ml/min
– temperatura kolumny	30 °C
– długość fali analitycznej	260 nm
– pętla dozownicza	20 µl.

9. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Do chromatografu wprowadzić za pomocą pętli dozowniczej po 20 µl roztworów wzorcowych roboczych wg pkt. 5.7. Z każdego roztworu wzorcowego należy wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać powierzchnie pików wg wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami nie powinna być większa niż ±5% tej wartości. Następnie wykreślić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych zawartość soli sodowej warfaryny w 1 ml roztworów wzorcowych w mikrogramach, a na osi rzędnych – odpowiadające im średnie powierzchnie pików.

Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych i sporządzanie krzywej wzorcowej.

10. Wykonanie oznaczenia

Po pobraniu próbki powietrza przenieść filtr z włókna szklanego do kolb Erlenmayera wg pkt. 6.4. Następnie dodać po 3 ml roztworu wody destylowanej wg pkt. 5.4., kolby szczelnie zamknąć i pozostawić na 30 min, wstrząsając ich zawartość, stosując wytrząsarkę wg pkt. 6.8. Następnie roztwory znad filtra przefiltrować, stosując nasadki filtracyjne wg pkt. 6.9. i wykonać oznaczenie chromatograficzne roztworu w warunkach określonych wg pkt. 8. Z każdego roztworu należy wykonać dwukrotny pomiar. Odczytać z uzyskanych chromatogra-

mów powierzchnie pików soli sodowej warfaryny wg wskazań integratora i obliczyć średnią arytmetyczną. Różnica między wynikami nie powinna być większa niż ±5% tej wartości. Z krzywych wzorcowych odczytać zawartość oznaczanej substancji w 1 ml badanego roztworu.

11. Wyznaczanie współczynnika odzysku

W pięciu kolbach Erlenmayera wg pkt. 6.4. umieścić filtry z włókna szklanego i następnie dodać mikrostrzykawką o pojemności 50 µl wg pkt. 6.3. po 20 µl roztworu do wyznaczenia współczynnika odzysku wg pkt. 5.8.

W szóstej kolbie przygotować próbkę kontrolną zawierającą czysty filtr. Kolby szczelnie zamknąć i pozostawić do następnego dnia. Następnie dodać po 3 ml wody destylowanej wg pkt. 5.4. i wstrząsać zawartością kolb przez 30 min, stosując wytrząsarkę mechaniczną wg pkt. 6.8.

Jednocześnie wykonać oznaczenie badanej substancji, co najmniej w trzech roztworach porównawczych, przygotowanych przez dodanie do 3 ml wody destylowanej wg pkt. 5.4. po 100 µl roztworu do wyznaczenia współczynnika odzysku wg pkt. 5.8. Oznaczenie badanej substancji wykonać wg pkt. 10.

Współczynnik odzysku soli sodowej warfaryny (d) obliczyć na podstawie wzoru:

$$d = \frac{P_d - P_o}{P_p},$$

w którym:

P_d – średnia powierzchnia pików soli sodowej warfaryny na chromatogramach roztworów po desorpcji,

P_o – średnia powierzchnia pików o czasie retencji soli sodowej warfaryny na chromatogramach roztworu kontrolnego,

P_p – średnia powierzchnia pików soli sodowej warfaryny na chromatogramach roztworów porównawczych.

Następnie obliczyć średnią wartość współczynników odzysku soli sodowej warfaryny (\bar{d}) jako średnią arytmetyczną otrzymanych wartości (d).

Współczynnik odzysku należy zawsze oznaczać dla każdej nowej partii filtrów z włókna szklanego stosowanych do pochłaniania.

12. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenia soli sodowej warfaryny (X) w badanym powietrzu obliczyć w miligramach na metr sześcienny, na podstawie wzoru:

$$X = \frac{C_1}{V \cdot \bar{d}} \cdot 3,$$

którym:

C_1 – stężenie soli sodowej warfaryny w roztworze znad filtra odczytana z krzywej wzorcowej, w mikrogramach na mililitr,

V – objętość przepuszczonego powietrza przez filtr, w litrach,

\bar{d} – średnia wartość współczynnika odzysku wyznaczonego wg pkt. 11.,

3 – objętość wody destylowanej użytej do wmywania soli sodowej warfaryny z filtrów, w mililitrach.

INFORMACJE DODATKOWE

Badania wykonano, stosując chromatograf cieczowy z detektorem DAD firmy Elite La-Chrom Merck-Hitachi, automatyczny dozownik próbek oraz komputer firmy Merck-

Hitachi, wyposażony w kolumnę Lichrospher CN o długości 25 cm i średnicy wewnętrznej 4,6 mm.