Andrzej Wiśniewski

Trwałość cefuroksymu w kroplach do oczu

Rozprawa doktorska

Praca wykonana
W Katedrze Technologii Postaci Leku
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy, UMK w Toruniu
i przedstawiona
Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w celu uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Promotor rozprawy**:**

dr hab. farm. Anna Kodym

Poznań 2011

Serdecznie dziękuję
Promotorowi dr hab. farm. Annie Kodym
za podanie tematu i stworzenie doskonałych warunków
do pracy naukowej, w nowo powstałej Katedrze
Technologii Postaci Leku Collegium Medicum
w Bydgoszczy, którą Pani Profesor kierowała.
Ponadto dziękuję za cenne uwagi, okazaną pomoc oraz
wyrozumiałość w trakcie wykonywania pracy.

Serdecznie dziękuję
Pani dr farm. Helenie Kukule z Katedry i Zakładu Bakteriologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu za przeprowadzenie oceny mikrobiologicznej rozpuszczalników.

Spis treści

I. WSTĘP 8
II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA 9
1. Cefalosporyny 9
1.1. Budowa chemiczna cefalosporyn 9
1.2. Mechanizm działania cefalosporyn 10
1.3. Klasyfikacja cefalosporyn 11
1.4. Działania niepożądane cefalosporyn 14
2. Mechanizmy obronne bakterii 15
3. Bakteryjne zakażenia narządu wzroku 18
3.1. Sposoby podawania antybiotyków w infekcji narządu wzroku 18
3.2. Obszary oka objęte zakażeniem bakteryjnym 20
3.2.1. Bakteryjne zapalenie spojówek 20
3.2.2. Bakteryjne zapalenie rogówki 21
3.2.3. Bakteryjne zakażenie w obrębie oczodołu 25
3.2.4. Bakteryjne zapalenie powiek 26
3.2.5. Zapalenie wnętrza gałki wywołane zakażeniem bakteryjnym 27
3.2.6. Bakteryjne zapalenie gruczołu łzowego 29
3.2.7. Zapalenie woreczka łzowego 29
4. Cefuroksym sodowy 30
4.1. Właściwości fizykochemiczne 30
4.2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa i zastosowanie w lecznictwie 31
4.3. Farmakokinetyka cefuroksymu sodowego 32
4.4. Preparaty handlowe cefuroksymu sodowego 33
4.5. Trwałość cefuroksymu sodowego w roztworach wodnych 34
4.6. Technologiczne aspekty sporządzania kropli do oczu z cefuroksymem sodowym 37
III. CEL PRACY 40
IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA 41
1. Materiał do badań 41
2. Odczynniki użyte do badań 42
3. Aparatura i sprzęt 44

4. Skład, sposób wykonania i właściwości fizykochemiczne roztworów substancji pomocniczych przeznaczonych do kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych 48
4.1. Bufory cytrynianowe 48
4.2. Roztwór alkoholu poliwinylowego 49
4.3. Roztwory środków konserwujących 50
4.3.1. Roztwór boranu fenylortęciowego 50
4.3.2. Alkohol β-fenyloetylowy 51
5. Badanie zgodności farmaceutycznej 5 % (w/w) roztworów wodnych cefuroksymu sodowego z substancjami pomocniczymi włączonymi do składu kropli 52
6. Skład, sposób wykonania, właściwości fizykochemiczne oraz ocena skuteczności przeciwdrobnoustrojowej rozpuszczalników przeznaczonych do wersji „przemysłowych" 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym 53
6.1. Skład rozpuszczalników przeznaczonych do wersji „przemysłowych" 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym 53
6.2. Sposób wykonania rozpuszczalników przeznaczonych do wersji „przemysłowych" kropli 55
6.3. Ocena fizyczna rozpuszczalników przeznaczonych do kropli „przemysłowych" w trakcie przechowywania 56
6.4. Badanie skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej rozpuszczalników przeznaczonych do wersji „przemysłowych" kropli, po 12 miesiącach przechowywania zgodnie z wytycznymi ICH……...65
7. Czynności przygotowawcze do pracy w warunkach aseptycznych 67
7.1. Substancja lecznicza użyta do sporządzania kropli do oczu oraz roztworów wodnych antybiotyku 67
7.2. Jałowe roztwory substancji pomocniczych 67
7.3. Przygotowanie sprzętu 67
7.4. Przygotowanie loży do pracy w warunkach aseptycznych 69
8. Aseptyczne sporządzanie 1 % i 5 % (w/w) kropli do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych oraz roztworów wodnych antybiotyku 69
8.1. Skład recepturowy kropli i roztworów wodnych antybiotyku 69
8.2. Uzasadnienie zaprogramowanego składu kropli 71
8.3. Tok postępowania przy sporządzaniu kropli do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych oraz roztworów wodnych antybiotyku według składu przedstawionego w tabeli 15 72

9. Aseptyczne sporządzanie 1 % i 5 % (w/w) kropli do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych” 74
9.1. Skład „przemysłowych” wersji kropli do oczu 74
9.2. Sposób wykonania kropli do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych” 76
10. Ocena fizyczna 1 % i 5 % (w/w) roztworów wodnych cefuroksymu sodowego i kropli do oczu w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C oraz kropli do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych”, przechowywanych w temperaturze 4 °C 77
10.1. pH kropli 77
10.2. Ciśnienie osmotyczne 78
10.3. Lepkość i gęstość kropli 78
10.4. Badania organoleptyczne 79
11. Analiza zmiany zawartości cefuroksymu sodowego w roztworach wodnych oraz kroplach w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C oraz w kroplach „przemysłowych”, przechowywanych w temperaturze 4 °C w ciągu 30 dni 100
11.1. Parametry pracy układu chromatograficznego 100
11.2. Skład i wykonanie fazy ruchomej 100
11.3. Metoda wzorca zewnętrznego 101
11.3.1. Roztwór wzorcowy cefuroksymu sodowego 102
11.3.2. Analiza regresji 105
11.4. Walidacja metody oznaczania cefuroksymu sodowego 108
11.4.1. Specyficzność 108
11.4.2. Dokładność 111
11.4.3. Precyzja 117
11.4.4. Granica wykrywalności (DL) 117
11.4.5. Granica oznaczalności (QL) 118
11.4.6. Liniowość metody 118
11.4.7. Robustness 119
11.5. Analiza zmiany zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % i 5 % (w/w) roztworach wodnych i kroplach do oczu, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C 122

11.5.1. Materiał do badań 122
11.5.2. Czas badań 122
11.5.3. Przygotowanie prób do analizy zmiany zawartości cefuroksymu sodowego w badanym materiale 122
11.5.4. Parametry rozdziału chromatograficznego 123
11.5.5. Zawartość cefuroksymu sodowego w badanym materiale 132
12. Produkty rozkładu cefuroksymu sodowego 156
V. Omówienie wyników 163
VI. Wnioski 189
VII. Streszczenie 192
VII. Summary 195
VIII. Piśmiennictwo 198
IX. Spis tabel 205
X. Spis rycin 211

I. WSTĘP

Pomimo szerokiego zastosowania cefuroksymu sodowego w lecznictwie, aktualnie brakuje na rynku farmaceutycznym postaci handlowej z tym antybiotykiem, przeznaczonej do leczenia miejscowych infekcji oczu. Cefuroksym sodowy, z uwagi na swoją małą toksyczność i szerokie spektrum działania, wykorzystywany jest w okulistyce w formie iniekcji dokomorowych w operacyjnym leczeniu zaćmy, czy też w formie „wzmocnionych kropli", które stanowią roztwory wodne antybiotyku, podawane do worka spojówkowego w infekcji rogówki. Leczenie bakteryjnych stanów zapalnych oka ograniczone jest tylko do oddziałów szpitalnych, gdzie roztwory wodne cefuroksymu przygotowywane są *ex tempore*. Z uwagi na ich ograniczoną trwałość mikrobiologiczną i właściwości fizykochemiczne, celowe staje się opracowanie kropli do oczu, o trwałości minimum kilkunastodniowej, która będzie spełniała wymogi farmakopealne przewidziane dla tej postaci leku, a ponadto będzie umożliwiała kontynuację leczenia poza szpitalem. Kluczowe jest więc zaprojektowanie kilku formulacji, o różnym składzie substancji pomocniczych i stężeniu antybiotyku, co umożliwi dobór odpowiednich kropli, w zależności od: stanu zakażenia oka i jego intensywności oraz obszaru objętego zakażeniem.

Punktem odniesienia w obecnych badaniach, było opracowanie w Katedrze Technologii Postaci Leku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu metodyki sporządzania 1 % kropli recepturowych z cefuroksymem sodowym, która obejmowała : sposób ich wykonania, dobór substancji pomocniczych oraz ocenę fizykochemiczną i mikrobiologiczną. Badania nad zastosowaniem antybiotyków cefalosporynowych w 1 % recepturowych kroplach do oczu były tematem rozprawy dr farm. Tomasza Zawiszy pt. „Technologia kropli do oczu z cefazoliną, cefuroksymem i ceftazydymem".

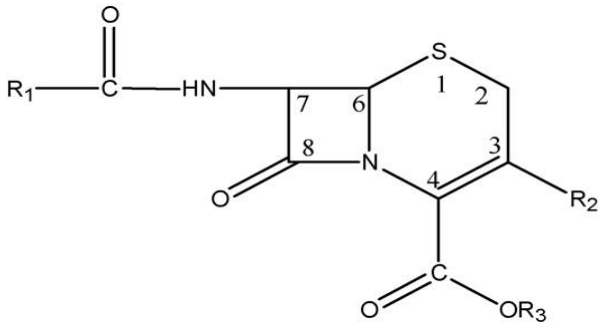
W niniejszej pracy rozszerzono technologię postaci recepturowych z cefuroksymem o krople 5 %. Ponadto wprowadzono w ramach oceny jakościowej, metody badania trwałości chemicznej antybiotyku za pomocą HPLC i odniesiono je do wcześniejszych badań mikrobiologicznych. Opracowano również technologię sporządzania rozpuszczalników do wersji „przemysłowych" kropli, wraz z ich oceną jakościową oraz metodykę sporządzania kropli 1 % i 5% w wersjach „przemysłowych", wraz z ich oceną fizykochemiczną po sporządzeniu, jak i w trakcie miesięcznego przechowywania w temperaturze 4 °C.

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Cefalosporyny

1.1. Budowa chemiczna cefalosporyn.

Cefalosporyny stanowią dużą grupę antybiotyków β – laktamowych, która wywodzi się od cefalosporyny C, wyizolowanej z produktów fermentacji grzyba *Cephalosporinum acremonium.* Odkrycia tego dokonał profesor Brotzu z Uniwersytetu z Cagliari na Sardynii, który wyniku swoich obserwacji stwierdził, że przy ujściu rur kanalizacyjnych do morza muszą żyć drobnoustroje, które wytwarzają substancje aktywne wobec pałeczek jelitowych. Cefalosporyny tak jak penicyliny posiadają 4 – członowy pierścień β- laktamowy, jednak zamiast 5 – członowego pierścienia tiazylidonowego, występuje tutaj 6 – członowy pierścień dihyrotiazynowy. Wprowadzenie do cząsteczki, układu dihydrotiazynowgo wywiera stabilizujący wpływ na wiązanie β – laktamowe, ponieważ hybrydyzacja azotu laktamowego, zbliżona do hybrydyzacji sp^2, zmniejsza reaktywność pierścienia β – laktamowego. Ponadto cefalosporyny nie mają charakterystycznej dla penicylin grupy metylowej w pozycji C2, natomiast wiązanie między węglami C3 i C4 jest nienasycone. Obecnie wszystkie cefalosporyny są pochodnymi kwasu 7 – aminocefalosporynowego (7 – AC), który pozyskiwany jest na drodze syntezy chemicznej z cefalosporyny C. Z uwagi na fakt, że cząsteczkę kwasu 7 – aminocefalosporynowego można modyfikować, zwłaszcza poprzez zmianę podstawników: R_1 przy węglu C3 i R_2 przy węglu C7, daje to ogromne możliwości stworzenia dużej liczby półsyntetycznych pochodnych .



Rycina 1. Kwas 7 – aminocefalosporynowy (R_1, R_2, R_3 = H).

Zmiana podstawnika R_2 przy węglu C3 wpływa na farmakokinetykę i trwałość metaboliczną antybiotyku, natomiast modyfikacja podstawnika R_1 przy węglu C7 wpływa na aktywność przeciwbakteryjną i oporność wobec β – laktamaz. Estryfikacja grupy karboksylowej przy węglu C4, za pomocą alkoholi, zwiększa lipofilność cefalosporyny, co powoduje wzrost dostępności biologicznej antybiotyku [1,2,3,4].

1.2. Mechanizm działania cefalosporyn.

Cefalosporyny stanowią grupę antybiotyków działających bakteriobójczo poprzez hamowanie syntezy ściany komórkowej bakterii, którą stanowi muramina. Jest ona peptydoglikanem, którego synteza przebiega przy udziale kwasu N - acetylomuraminowego i N – acetylomuraminy, natomiast końcowy fragment łańcucha peptydowego stanowi D – alanylo – D – alanina. W wyniku działania enzymu bakteryjnego – transpeptydazy, następuje połączenie muraminy przez końcowe fragmenty D – alanylo – D – alaninowe, z wydzieleniem cząsteczki D – alaniny. Inny enzym – karbopeptydaza pełni rolę regulacyjną w procesie łączenia muraminy. Antybiotyki cefalosporynowe wiążą się kowalencyjnie z miejscem aktywnym transpeptydazy, w wyniku czego funkcja enzymu zostaje zahamowana. Powinowactwo cefalosporyn do enzymów bakteryjnych zlokalizowanych w błonie cytoplazmatycznej wynika z podobieństwa grupy amidowej w pierścieniu β - laktamowym do pentapeptydu peptydoglikanu. Ponadto w wyniku działania antybiotyków β – laktamowych dochodzi także do zmiany aktywności karboksypeptydazy i endopeptydazy, czego skutkiem jest nagromadzenie wewnątrz komórki bakteryjnej urydyno-5-pirofosforanu i N-acetylowanych pochodnych muraminy. Trwałe łączenie się cefalosporyn z enzymami katalizującymi proces tworzenia muraminy (zwanymi białkami wiążącymi penicyliny – PBP) nie jest jedynym mechanizmem prowadzącym do rozpadu komórki bakteryjnej, ponieważ antybiotyki β – laktamowe unieczynniają również inhibitory hydrolaz muraminy, co powoduje nasilenie procesu autolizy i osłabienie inwazyjności bakterii [5].

1.3. Klasyfikacja cefalosporyn.

Obecnie istnieje kilka podziałów antybiotyków cefalosporynowych. Najbardziej popularna klasyfikacja wyróżnia wśród nich: I generację, II generację, III generację oraz IV generację i w głównej mierze oparta jest na czasie wprowadzenia antybiotyku do lecznictwa oraz podatności na działanie β-laktamaz. Bardziej praktyczny podział, stworzony przez Williamsa w 1987 r., dzieli cefalosporyny na cztery grupy i opiera się głównie na zakresie działania antybiotyku. Ujednolicając te dwie klasyfikacje wśród cefalosporyn można wyróżnić: [2,6,]:

- **Grupa 0 wg Williamsa,** do której należą cefalosporyny I i II generacji.

  Są to cefalosporyny podawane doustnie o biodostępności ok. 90 %. Pokarm nie wpływa na ich wchłanianie lub wpływa w niewielkim stopniu. Nie przenikają do płynu mózgowo-rdzeniowego, natomiast stężenie w wydzielinie gruczołów drzewa oskrzelowego i płynie ucha środkowego wynosi 10 – 20 % stężenia osiąganego w surowicy. Wysokie stężenia tych cefalosporyn osiągane są w moczu, migdałkach podniebiennych oraz błonie śluzowej oskrzeli. Cefalosporyny I generacji silnie działają bakteriobójczo na bakterie Gramm-dodatnie, w szczególności *Streptococcus* sp. i *Staphylococcus* sp. Praktycznie nie działają na ziarenkowce Gram-dodatnie z rodziny *Enterococcus* oraz Gram-ujemne pałeczki z rodzinny *Enterobacteriaceae.* Cefalosporyny II generacji w porównaniu do I generacji są bardziej oporne na β-laktamzay i słabiej działają na bakterie Gram-dodatnie, natomiast posiadają dużą aktywność wobec bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae*). Cefalosporyny grupy 0 wg Williamsa są stosowane w lekkich i średnio - ciężkich niepowikłanych zakażeniach dróg oddechowych, dróg moczowych oraz tkanek miękkich. Do antybiotyków tej grupy należą:

  - I generacja: cefaleksyna, cefadroksyl, cefradyna
  - II generacja: cefaklor, cefprozil

- **Grupa 1 wg Williamsa,** do której należą cefalosporyny I generacji

  Do tej grupy należą tylko cefalosporyny I generacji podawane dożylnie. Charakteryzują się one znaczną aktywnością wobec bakterii Gram-dodatnich i są całkowicie oporne na penicylinazę gronkowcową. Z uwagi na to, że nie są wskazane w zakażeniach o ciężkim przebiegu, obecnie podstawowym ich zastosowaniem jest profilaktyka przed „czystymi" zabiegami operacyjnymi. Charakteryzują się one dobrą dystrybucją, jednak w bardzo małym stopniu przenikają do płynu mózgowo-rdzeniowego, a ich stężenie w wydzielinie gruczołów drzewa oskrzelowego sięga około 25 % stężenia występującego w surowicy. Do tej grupy cefalosporyn należy: cefazolina, cefalotyna, cefapiryna, ceftezol oraz cefatryzyna.

- **Grupa 2 wg Williamsa,** do której należą cefalosporyny II i III generacji.

  W tej grupie występują preparaty podawane zarówno doustnie, jak i pozajelitowo. Grupa ta charakteryzuje się zwiększoną opornością na β-laktamazy, dzięki obecności grup: 7-iminometoksy- lub metylotiotetrazolowej (MTT). Do II generacji cefalosporyn tej grupy należą : cefuroksym, cefamanadol, cefonicid, ceforanid i cefotiam. Do III generacji natomiast zalicza się: cefetamet, cefiksym, cefotaksym, cefpodoksym, ceftizoksym i ceftriakson. Cefalosporyny II generacji, o zastosowaniu doustnym wskazane są w przypadku, kiedy brak poprawy po cefalosporynach grupy 0. Z uwagi na większą oporność na β-laktamazy, w takim wypadku celowe jest stosowanie estru acetoksyetylowego cefuroksymu. Wskazaniem dla preparatów pozajelitowych są zakażenia dróg oddechowych, z uwagi na wysokie stężenie antybiotyków w wydzielinie drzewa oskrzelowego, po podaniu dożylnym lub domięśniowym. Ponadto stosuje się je w zakażenia dróg moczowych, w posocznicach, zakażeniach kości i stawów, a w przypadku cefuroksymu sodowego, w zakażenia ośrodkowego układu nerwowego. Cefalosporyny III generacji, podawane pozajelitowo, powinny być stosowane w ciężkich lub zagrażających życiu zakażeniach i podobnie jak preparaty doustne nie powinny być lekami pierwszego rzutu, z uwagi na to, że niesie to za sobą ryzyko szerzenia oporności. Tak jak cefalosporyny II generacji, w ramach tej grupy, charakteryzują się dużą aktywnością wobec bakterii Gramm-dodatnich oraz Gramm-ujemnych, z wyjątkiem enterokoków, metycylinoopornych szczepów gronkowca złocistego i rodzaju *Pseudomonas* sp. Ponadto III generacja charakteryzuje się zmniejszoną

podatnością na β-laktamazy, z wyjątkiem enzymów o poszerzonym spektrum działania ESBL i AmpC.

- **Grupa 3 wg Williamsa,** do której należą cefalosporyny III i IV generacji.

  Do tej grupy należą antybiotyki cefalosporynowe wykazujące aktywność wobec *Pseudomonas aeruginosa,* co kwalifikuje je do terapii celowanej, której wdrożenie powinno być poprzedzone wykonaniem antybiogramu. Wskazaniem do stosowania III i IV generacji są ciężkie i zagrażające życiu zakażenia wywoływane przez *Pseudomonas aeruginosa, Enterobacteriaceae* sp., *Haemophilus influenzae* oraz *Neisseria* sp., a także bakteriami Gramm-dodatnimi, w tym paciorkowcami i gronkowcami. Antybiotyki należące do IV generacji charakteryzują się najwyższą skutecznością z uwagi na oporność na β-laktamazy, również na te o rozszerzonym spektrum działania. Ponadto budowa chemiczna tej grupy antybiotyków, uwarunkowana obecnością azotu czwartorzędowego w łańcuchu bocznym oraz grupy karboksylowej, powoduje że związek ma charakter jonu obojnaczego. Taka budowa cząsteczki umożliwia łatwiejszą penetrację antybiotyku przez pory w błonie komórkowej bakterii oraz większe powinowactwo do białek PBP. Do antybiotyków tej grupy należą:

  - cefalosporyny III generacji podawane pozajelitowo: cefoperazon i ceftazydym
  - cefalosporyny IV generacji podawane pozajelitowo: cefpirom i cefepim

- **Grupa 4 wg Williamsa,** do której należą cefalosporyny II generacji.

  Do tej grupy antybiotyków należą: cefmetazol, cefotetan i cefoksytyna. Cechą charakterystyczną tej grypy, zwanej cefamycynami, jest wysoka oporność na β-laktamazy, zwłaszcza te o rozszerzonym spektrum działania. Z uwagi na silne właściwości indukujące te enzymy, grupa ta wykazuje wysoką aktywność wobec szczepów *Bacteroides fragilis.*

1.4. Działania niepożądane cefalosporyn.

Głównym działaniem niepożądanym pojawiającym się podczas stosowanie antybiotyków cefalosporynowych są reakcje alergiczne, które objawiają się reakcjami skórnymi, gorączką, chorobą posurowiczą, eozynofilią oraz czasami wstrząsem anafilaktycznym [1,6]. Zaobserwowano, że cefalosporyny wykazują reakcję krzyżową z przeciwciałami przeciw penicylinom. Stwierdzono, że immunogenność cefalosporyn III generacji jest mniejsza niż cefalosporyn I i II generacji, co może wynikać z większej masy łańcuchów bocznych w ich strukturze. [7]. Ponadto sugeruje się, że duży wpływ na występowanie zależności krzyżowej między cefalosporynami I generacji a penicylinami miał fakt, że w przeszłości te preparaty były zanieczyszczone śladowymi ilościami penicyliny [8,9]. Zauważono, że reakcje krzyżowe między penicylinami a cefalosporynami są rzadkie, zwłaszcza wśród III generacji i najprawdopodobniej nie większe niż pomiędzy penicylinami a antybiotykami strukturalnie niepowiązanymi. Poważne reakcje alergiczne mogą wystąpić u 0,02 % pacjentów przyjmujących cefalosporyny [9,10]. U pacjentów uczulonych na penicylinę zaobserwowano wzrost reakcji alergicznych po podaniu : cefaleksyny, cefalotyny, cefalorydyny, cefazoliny i cefamandolu, natomiast taki efekt nie nastąpił po podaniu cefprozilu, cefuroksymu, ceftriaksonu i ceftazydymu. Okazało się, że w przewidywaniu reakcji krzyżowych pomiędzy cefalosporynami i penicylinami kluczową rolę może mieć podobieństwo w strukturze łańcucha bocznego antybiotyków. Wcześniejsze badania świadczące o tym, że ryzyko takiej reakcji wynosi 10 % jest nieuzasadnione [10,11].

Działania niepożądane ze strony przewodu pokarmowego po podaniu antybiotyków cefalosporynowych objawiają się zaburzeniami flory bakteryjnej, której następstwem mogą być : biegunki, kandydozy lub rzadziej rzekomobłoniaste zapalenie jelit. Objawy takie występują przede wszystkim po antybiotykach podawanych doustnie, ale również po cefalosporynach podawanych pozajelitowo, które są wydzielane z żółcią, na przykład po cefoperazonie i ceftriaksonie. Niektóre cefalosporyny mogą również wywoływać reakcje disulfiramopodobne, jak na przykład cefamandol i cefoperazon. W zawiązku z tym, przy stosowaniu tych antybiotyków powinien obowiązywać zakaz spożywania alkoholu. Potencjalne działanie neufrotoksyczne może wystąpić przy stosowaniu dużych dawek cefalosporyn oraz przy jednoczesnym stosowaniu furosemidu, czy też aminoglikozydów. Przy długotrwałym podawaniu cefalosporyn wskazane jest uzupełnianie witaminy K, co zmniejszy ryzyko rozwoju hipoprotrombinemii. W przypadku podawania antybiotyków dożylnie może dojść do

stanu zapalnego żyły i tworzenia zakrzepu, natomiast po podaniu domięśniowym może wystąpić bolesność i stwardnienie w miejscu iniekcji [2,6,12].

2. Mechanizmy obronne bakterii.

Oporność bakterii na antybiotyki β – laktamowe może być związana z kilkoma mechanizmami, które mogą występować w dowolnych kombinacjach [13] :

- wytwarzaniem enzymów β – laktamaz, które powodują inaktywację antybiotyku
- zmianami w białkach wiążących penicyliny (PBP)
- zmianą przepuszczalności osłon komórkowych poprzez wytwarzanie zmniejszonej liczby białek porynowch (OMP)

Najważniejszym mechanizmem oporności jest wytwarzanie β-laktamaz, które wg klasyfikacji Amblera dzielą się na cztery klasy, od A do D. Podział ten oparty jest na sekwencjach aminokwasów hydrolizujących β-laktamy. Mechanizm działania β-laktamaz oparty jest na hydrolizie wiązania C - N w pierścieniu β-laktamowym. Do klasy A β-laktamaz zalicza się enzymy o szerokim spektrum działania np. TEM-1, TEM-2 oraz SHV-1, występujące powszechnie u rodziny *Enterobacteriaceae* i z których najczęściej na drodze mutacji powstają β-laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ESBL), które warunkują duży stopień oporności na penicyliny, ceftazydym i aztreonam. Enzymy te często produkowane są przez *Klebsiella* sp. oraz *Escherichia coli*, ale mogą być również wytwarzane przez inne bakterie Gramm-ujemne jak: *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp., *Proteus* sp. i *Citrobacter* sp. [14,15,16,17]. Pierwsze β-laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ESBL) zostały odkryte w 1980 roku u *Klebsiella pneumoniae i Serratia marcescens*., kiedy to do lecznictwa wprowadzono cefotaksym. Enzymy powodujące hydrolizę cefotaximu oznaczono jako SHV-2 oraz TEM-3, z uwagi na to, że powstały w wyniku mutacji polegającej na zamianie aminokwasów odpowiednio w β-laktamazach SHV-1 oraz TEM-2 [18,19]. Oprócz ESBL typu TEM i SHV wykryto również enzym PER-1, który zidentyfikowano na terenie Turcji u *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii oraz Salmonella typhimurium*. Szczepy bakterii produkujące ten typ β-laktamazy charakteryzują się wysoką opornością na ceftazydym i gentamycynę, pośrednią opornością na amikacynę oraz wrażliwością lub umiarkowaną wrażliwością na imipenem oraz meropenem [20]. Do klasy A β-laktamaz należy również enzym VEB-1, zwany również CEF-1, który zidentyfikowano u *Eschericha coli, Klebsiella pneumoaniae* i *Enetrobacter* sp. w 1999

roku w Tajlandii, gdzie u 37 hospitalizowanych pacjentów stwierdzono oporność na ceftazydym. Zarówno PER-1, jak i VEB-1 mogą być kodowane przez bakterie chromosomalnie, jak i plazmidowo [21].

Do klasy B β-laktamaz należą enzymy, które w miejscu aktywnym zawierają dwuwartościowy jon cynku, w odróżnieniu od klasy A, C i D, które należą do β-laktamaz serynowych. Enzymy te nazwano metalo-β-latamazami i zostały wykryte w latach dziewięćdziesiątych w Japonii. Wyizolowano je ze szczepu *Serratia marcescens* i nazwano IMP-1. Do tej pory z powodzeniem stosowany w lecznictwie imipenem, w walce z bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae,* był nieskuteczny w przypadku infekcji szczepem *Serratia marcescens,* natomiast oporny na rozkład wobec IMP-1 okazał się aztreonam. Enzym IMP-1 powodował również szybką hydrolizę penicyliny i cefalosporyn. Stwierdzono, że skoro jest to metalo-β-laktamaza kodowana chromosomalnie, to drogą koniugacji lub transdukcji z czasem rozpowszechni się również u innych bakterii z tej samej rodziny. [22]. Także w Japonii wyizolowano metalo-β-latamazę ze szczepu *Pseudomonas aeruginosa*, która była kodowana plazmidowo i oznaczono ją jako pMs350. Enzym ten hydrolizował imipenem, oksyiminocefalosporyny, 7-metoksycefalosporyny i penicyliny, natomiast nie hydrolizował aztreonamu [23]. Zarówno aktywność IMP-1, jak i pMs350 była hamowana poprzez dodanie do enzymów EDTA i przywrócona po dodaniu $ZnCl_2$ [22,23].

Do klasy C β-laktamaz, zwanych cefalosporynazami, należą enzymy kodowane chromosomalnie. Podobnie jak klasa A, hydrolizują penicyliny i cefalosporyny. Nie rozkładają cefepimu, aztreonamu i karbapenemów oraz nie są hamowane przez kwas klawulanowy. Powszechnie występują u bakterii Gram-ujemnych i ich znaczenie wzrosło równolegle z częstością pojawiania się w mikroorganizmach powszechnie występujących w otoczeniu, jak i w szpitalach np. u *Escherichia coli*, czy też *Klebsiella pneumoniae* [24]. Oprócz rodziny *Enterobacteriaceae* ten typ β-laktamaz powszechnie występuje u pałeczek *Acinetobacter* sp. Przykładem może być pałeczka *Acinetobacter baumannii* odpowiedzialna za groźne infekcje dróg moczowych, płuc, serca i opon mózgowych, u której oprócz plazmidowo kodowanych β-laktamaz typu A i D, wyizolowano enzym AmpC kodowany chromosomalnie [25]. Ostatnie doniesienia sugerują, że geny kodujące enzymy AmpC znajdują się również w plazmidach, czego konsekwencją może być pojawianie się tych enzymów u bakterii, u których do tej pory

był brak lub słaba ekspresja genów chromosomalnych bla (AmpC) np. u *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* i *Proteus mirabilis* [26].

Klasa D β-laktamaz, zwana inaczej enzymami hydrolizującymi oksacylinę (typ OXA) została wykryta w latach osiemdziesiątych. Ten typ enzymów hydrolizuje oksacylinę i kloksacylinę szybciej niż benzylpenicylinę i nie są tak dobrze hamowane prze kwas klawulonowy jak β-laktamazy klasy A. OXA β-laktamazy występują głównie u *Pseudomonas aeruginosa*, ale zostały również wykryte u innych bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* np. OXA-1, OXA-4 i OXA-7 u *Escherichia coli*, OXA-2 i OXA-3 u *Salmonella typhimurium*, czy też OXA-9 u *Klebsiella pneumoniae* [27].

Drugi mechanizm oporności bakterii polega na modyfikacji struktury białka wiążącego penicylinę (PBP). Został on dobrze poznany na przykładzie białka PBP2a, kodowanego przez gen mecA, które jest produkowane przez metycylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus* (MRSA) i odznacza się małym powinowactwem do wszystkich antybiotyków β-laktamowych [3]. Podobnie u szczepów *Escherichia coli*, oporność na karbapenemy jest związana z syntezą zmodyfikowanych białek PBP2 i PBP3 [28].

U bakterii Gram-ujemnych warstwa mureiny otoczona jest błoną zewnętrzną w skład której wchodzą: białka, fosfolipidy oraz lipopolisacharydy. Antybiotyki drogą dyfuzji są transportowane do miejsca swojego działania przez kanały porynowe błony, które są utworzone z białek (OMP). Stwierdzono, że z jeden z mechanizmów oporności bakterii na antybiotyki polega na redukcji liczby białek porynowych lub tworzeniu kanałów o mniejszej średnicy, co czyni je nieprzepuszczalnymi dla związków wielkocząsteczkowych. Udowodniono między innymi, że oporność szczepów *Acinetobacter baumannii* na amikacynę, tobramycynę, cyprofloksacynę, ceftazydym oraz imipenem była ściśle związana ze zmniejszoną produkcją przez bakterie białek porynowych o masie 33 – 36 kDa. [29]. Podobnie zmniejszenie produkcji białka OprD przez szczepy *Pseudomonas aeruginosa* powodowało wzrost oporności bakterii na imipenem [30]. Oporność szczepów *Escherichia coli* na tetracykliny była również związana z regulacją syntezy trzech białek porynowych, gdzie w wyniku zwiększonej syntezy białka OmpC oraz zmniejszonej syntezy białka LampB zaobserwowano zmniejszoną przepuszczalność membrany bakterii. Ponadto zwiększenie syntezy białka TolC dodatkowo podnosiło efektywność „pompy wypływu" do transportu antybiotyku z wnętrza komórki bakteryjnej [31].

3. Bakteryjne zakażenia narządu wzroku.

Najczęstszą przyczyną bakteryjnych infekcji oczu są drobnoustroje z rodzajów *Staphylococcus* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia* sp. oraz *Haemophilus* sp. i mogą być one zlokalizowane w obrębie oczodołu, powiek, gruczołu łzowego i drogi łzowej, spojówek, rogówki, siatkówki, błony naczyniowej oraz wnętrza gałki ocznej [2].

3.1. Sposoby podawania antybiotyków w infekcji narządu wzroku.

Aby uzyskać wymagane, efektywne stężenie antybiotyku stosuje się drogi podania miejscowe oraz ogólne, co uzależnione jest od miejsca infekcji [2]. Do miejscowo podawanych preparatów zalicza się [32,33] :

- postacie płynne : krople do oczu, płyny do oczu, wstrzyknięcia do oczu
- postacie półstałe : maści do oczu
- postacie stałe : inserty, systemy terapeutyczne, proszki do sporządzania kropli i płynów do oczu

Z wymienionych postaci leku najczęściej stosowane są postacie płynne (75 %), a następnie postacie półstałe (23 %) i stałe postacie leku (2%). Krople do oczu w postaci wodnych roztworów wymagają kilkukrotnej aplikacji w ciągu dnia. Wprowadzenie do worka spojówkowego 1 kropli o objętości 50 µL powoduje szybkie wypłukanie leku z powierzchni oka, czego przyczyną jest ograniczona pojemność samego worka spojówkowego, która wynosi 30 µL. Z uwagi na ciągłe odtwarzanie płynu łzowego z szybkością 1 µL/min przyjmuje się, że czas działania kropli może maksymalnie wynosić 10 min. Zastosowanie kropli wodnych o zwiększonej lepkości wydłuża czas kontaktu leku z okiem, na skutek bioadhezji i zmniejszonego łzawienia. Przy czym przyjmuje się, że maksymalna lepkość takich kropli nie może być większa niż 20 mPa•s. Efekt przedłużonego działania kropli można uzyskać również przy zastosowaniu kropli olejowych. Jednak w tym przypadku, podobnie jak ma to miejsce w maściach, następuje zaburzenie widzenia. Stąd częste zalecenia lekarskie, aby te preparaty były stosowane na noc. W przypadku kropli w postaci roztworów wodnych o zwiększonej lepkości oraz kropli olejowych, czas kontaktu leku z powierzchnią rogówki wydłuża się do 30 minut, podczas gdy po zastosowaniu maści do 2 godzin [32].

W celu uzyskania większego stężenia antybiotyku w cieczy wodnistej oka stosuje się iniekcje podspojówkowo o objętości 0,25 mL – 1,0 mL. Wadą tego typu podania leku

jest bolesne wkłucie, możliwość tworzenia blizn oraz krótkotrwałe wysokie stężenie antybiotyku na skutek wchłaniania leku do krążenia naczyniówkowego i siatkówkowego oraz jego częściowe cofanie przez kanał wkłucia. Dlatego przy zapaleniach bakteryjnych rogówki zalecane jest podawanie miejscowe, do worka spojówkowego, wzmocnionych preparatów antybiotykowych w postaci kropli. Preparaty te są otrzymywane przez rozpuszczenie handlowej postaci leku do stosowania pozajelitowego w jałowej wodzie lub w roztworach sztucznych łez. W leczeniu szpitalnym stosuje się często roztwory wodne stanowiące połączenie aminoglikozydów i cefalosporyn np. krople zawierające w swoim składzie tobramycynę w stężeniu 14 mg/mL i cefazolinę w stężeniu 50 mg/mL lub krople zawierające amikacynę w stężeniu 25 mg/mL i ceftazydym w stężeniu 25 mg/mL. W pierwszym etapie leczenia w ciągu 24 h, świeżo sporządzone roztwory antybiotyków w jałowej wodzie podawane są pacjentom co 1 h [1,2,34].

Iniekcje do komory przedniej oka oraz do ciała szklistego stosowane są w zapaleniach wewnątrzgałkowych. Podanie antybiotyków do komory przedniej oka ma ograniczone zastosowanie z uwagi na ciągłe krążenie cieczy wodnistej, co powoduje szybki spadek stężenia leku. Iniekcje do ciała szklistego podawane są w niewielkiej objętości do 0,2 mL i w celu uniknięcia nadmiernego podwyższenia ciśnienia wewnątrz gałkowego, taką samą objętość płynu ciała szklistego usuwa się przed wstrzyknięciem. Antybiotyk podany do ciała szklistego może utrzymywać swoje stężenie terapeutyczne do 96 h i jest usuwany przez komorę przednią i tylną gałki ocznej [1] .

Ogólnoustrojowe podawanie antybiotyków ma ograniczone zastosowanie, z uwagi na to, że uzyskiwane stężenie antybiotyku w tkance oka jeż mniejsze niż przy podaniu miejscowym i stosuje się tę drogę najczęściej w sytuacji, kiedy stanowi zapalnemu np. rogówki towarzyszą infekcje innych tkanek w organizmie. Bariery: krew – siatkówka, krew – ciecz wodnista stanowią istotną przeszkodę dla przenikania leku. Substancje o wyższej rozpuszczalności w lipidach i niezjonizowane charakteryzują się lepszą przenikalnością przez błony komórkowe niż związki o mniejszej rozpuszczalności w lipidach i zjonizowane. Przykładem są cefalosporyny np. cefazolina sodowa, która w pH fizjologicznym jest zjonizowana i po podaniu dożylnym, pomimo powtórzenia dawki, nie przenika do tkanek oka. Dopiero stan zapalny tkanki oka powoduje zwiększoną penetrację cefazoliny, do uzyskania średnio stężenia 10,9 mcg/mL. Takie stężenie antybiotyku jest uzyskiwane dopiero po siedmiu iniekcjach dożylnych, wykonywanych co 8h. Wadą tego sposobu podawania leku jest fakt, że stopień

penetracji leku jest ściśle uzależniony od stanu zapalnego, co powoduje, że najwyższe stężenie antybiotyku w tkankach oka jest uzyskiwane w ostrym, początkowym stanie zapalnym i nie jest możliwe jego utrzymanie w trakcie kuracji, kiedy następuje złagodzenie objawów. Ponadto iniekcja dożylna cefazoliny sodowej pozwoliła na uzyskania minimalnego stężenia hamującego (MIC) dla *Staphylococcus epidermidis,* podczas gdy dla *Staphylococcus aureus* nie uzyskano efektywnego stężenia antybiotyku w tkance oka, natomiast dla cefamandolu, po podaniu dożylnym w ogóle nie uzyskano terapeutycznego stężenia w tkance oka wobec Gram-ujemnych bakterii [1,35].

3.2. Obszary oka objęte zakażeniem bakteryjnym.

3.2.1. Bakteryjne zapalenie spojówek.

Bakteryjne zapalenie spojówek może mieć przebieg: nadostry, ostry i przewlekły. **Zapalenie nadostre** wywoływane jest przez *Neisseria gonorrhoeae* i najczęściej występuje u noworodków, na 2 – 4 dzień po urodzeniu oraz obserwuje się je też czasami u dorosłych. Objawia się silnym obrzękiem powiek, spojówek oraz obecnością obfitej ropnej wydzieliny. Ponadto dochodzi do powiększenia węzłów chłonnych, gdzie w ciężkich przypadkach może dojść do ich ropnego zapalenia. Obecnie infekcje spojówek dwoinką rzeżączki rzadko występują u noworodków, ponieważ bezpośrednio po urodzeniu profilaktycznie stosowany jest zabieg Crédego, który polega na podaniu 1 % roztworu azotanu srebra do worka spojówkowego. W leczeniu nadostrego zapalenia spojówek stosowane są antybiotyki podawane miejscowo, w postaci kropli i maści do oczu, które zawierają: gentamycynę, erytromycynę lub bacytracynę. Początkowo krople są podawane co godzinę przez dobę, a następnie po ustąpieniu wydzielania ropy, do worka spojówkowego aplikowane są maści. Ogólnie podawane są antybiotyki cefalosporynowe III generacji, jak cefotaksym i ceftriakson. W zapaleniach nie obejmujących rogówkę podawane są one domięśniowo, zarówno dzieciom, jak i dorosłym. W sytuacji, gdy dochodzi do owrzodzenia rogówki stosuje się te same antybiotyki podawane we wlewie dożylnym. [36,37,38,39,40].

Ostre zapalenie spojówek, które nazywane jest prostym bakteryjnym zapaleniem spojówek, występuje najczęściej u dzieci. Wywołują je patogeny przenoszone przez brudne ręce lub czasami jest ono związane z przejściem zakażenia z nosa lub zatok przynosowych. Ten stan zapalny wywołują: *Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae* oraz *Moraxella catarrhalis.* Objawia się ono

zaczerwieniem spojówki, uczuciem piasku pod powiekami oraz ropną wydzieliną. W leczeniu ostrego zapalenia bakteryjnego spojówek stosuje się przez 5 – 7 dni antybiotyki w postaci kropli lub maści, takie jak: gentamycynę, tobramycynę, neomycynę oraz fluorochinolony: ciprofloksacynę i ofloksacynę. Zarówno w ostrym jak i nadostrym zapaleniu spojówek ważne są zabiegi pielęgnacyjne polegające na rozwieraniu powiek oraz dokładnym wypłukiwaniu ropnej wydzieliny za pomocą jałowego 0,9 % roztworu chlorku sodu [36,37,38,39,40].

Wśród bakteryjnych infekcji spojówek można wyszczególnić również **zapalenie przewlekłe**, czyli trwające dłużej niż 4 tygodnie. Jest ono wywoływane przez bakterie *Staphylococcus* sp., *Proteus mirabilis, Serratia marcescens, Escherichia coli.* Przewlekłe pęcherzykowate zapalenie spojówek zachodzące również na rogówkę, mogą wywoływać bakterie z rodzaju *Moraxella* sp. Często przyczyną pojawienia się stanu zapalnego jest zapalenie brzegów powiek oraz zespół suchego oka. Objawia się ono przekrwieniem oraz pogrubieniem spojówki i niewielką ilością wydzieliny śluzowo-ropnej. W stanie przewlekłego zapalenia spojówek zaleca się codzienną pielęgnację powiek np. rozcieńczonym szamponem dla dzieci oraz stosowanie miejscowe, dwa razy dziennie przez 3-4 tygodnie na powieki i rzęsy, maści zawierających erytromycynę lub bacytracynę. Pomocne może być również stosowanie miejscowe sterydów np. deksametazonu, zwłaszcza gdy stan zapalny objął również rogówkę. W przypadku pacjentów nie reagujących na preparaty stosowane miejscowo, dodatkowo do terapii włącza się antybiotyki podawane ogólnie i najczęściej są to tetracykliny [37,38,40].

3.2.2. Bakteryjne zapalenie rogówki.

Bakteryjne zapalenie rogówki jest ostrym lub przewlekłym zakażeniem rogówki, które może być przemijające lub nawrotowe. Zlokalizowane ono jest w różnych częściach rogówki, takich jak jej obwód lub centrum [40]. Do czynników odpowiedzialnych za pojawienie się bakteryjnego zakażenia rogówki należą:

- **Noszenie soczewek kontaktowych**. W tym wypadku szczególnie narażone są osoby stosujące miękkie soczewki kontaktowe. Stwierdzono, że częstość występowania wrzodziejącego zapalenia rogówki u osób noszących soczewki kontaktowe w systemie dziennym wynosi 1:2500 w skali roku, podczas gdy u osób noszących soczewki w systemie przedłużonym częstotliwość infekcji jest pięciokrotnie wyższa. W 60 % przypadków patogenem odpowiedzialnym za rozwój

stanu zapalnego jest pałeczka ropy błękitnej. Zakażenie głównie występuje przy nieprzestrzeganiu zasad higieny, ale może się również pojawić przy prawidłowej pielęgnacji soczewek kontaktowych. Powodem tego jest namnażanie bakterii w pojemniczkach do przechowywania soczewek kontaktowych, gdzie biofilm bakteryjny chroni je przed dezynfekcją. Dodatkowym czynnikiem sprzyjającym infekcji może być fakt, że samo nałożenie soczewki wywołuje niedotlenienie rogówki oraz wzrost jej temperatury i spowolnienie przepływu filmu łzowego, co powoduje, że u osób śpiących w soczewkach ryzyko zakażenia rogówki jest 9 – 15 razy większe niż u osób noszących tylko soczewki w dzień. [37,39,40].

- **Urazy**. Tutaj przede wszystkim zalicza się zbiegi chirurgiczne na rogówce, oparzenia chemiczne, czy też urazy powodujące przerwanie ciągłości rogówki na skutek : zadrapania lub erozji rogówki np. paznokciem, pęknięcia pęcherza nabłonkowego, obecnością ciała obcego w rogówce, martwicą spowodowaną wrzodem nieżytowym oraz stosowaniem długotrwałym leków sterydowych w kroplach [37,39,40].
- **Choroby powierzchni oka**. Infekcja rogówki może być skutkiem takich schorzeń jak: zespół suchego oka, przewlekłe zapalenie brzegów powiek, zwyrodnienie pęcherzowe rogówki, przewlekłe zapalenie brzegów powiek, nieprawidłowy wzrost rzęs i choroby alergiczne [37,39,40].
- **Inne czynniki**. Bakteryjne zapalenie rogówki może być następstwem cukrzycy, odry, różyczki, niedoborem witaminy A, a także podawaniem miejscowych lub ogólnych leków immunosupresyjnych.

Głównymi patogenami odpowiedzialnymi za rozwój bakteryjnego zapalenia rogówki są:

- *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus* – obydwie bakterie prowadzą do powstania trudno gojących się owrzodzeń, które może doprowadzić do perforacji rogówki.
- *Streptococcus pneumoniae, Streptococcus viridans, Streptococcus pyogenes.*
- *Pseudomonas aeruginosa*. Jest to jeden z najgroźniejszych patogenów wywołujących zapalenie rogówki, z uwagi na zdolność wytwarzania enzymów niszczących rogówkę (elastaza, proteaza, proteoglikonaza i fosfolipaza) oraz trzech egzotoksyn (A, B i C).
- *Serratia marcescens* – patogen często izolowany z soczewek kontaktowych

- *Bacillus cereus* – wywołuje groźne zapalenie rogówki, które zaczyna się od nacieków, a może doprowadzić do przebicia rogówki.
- *Moraxella lacunata* – wywołuje infekcję rogówki u chorych zaniedbanych, cukrzyków, przewlekle niedożywionych oraz alkoholików.
- *Listeria monocytogenes* – głownie wywołuje wrzodziejące zapalenie rogówki u hodowców zwierząt.
- *Mycobacterium fortuitum* – przyczyną infekcji tą bakterią jest uraz rogówki przedmiotem zanieczyszczonym ziemią
- *Clostridium* sp. np. *Clostridium diphtheriae*
- *Haemophilus influenzae.*
- *Proteus* sp.
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Neisseria gonorrhoeae*

Głównym objawem infekcji rogówki jest owrzodzenie, które najczęściej stanowi szarobiałe lub szarożółte zagłębienie, które otoczone jest naciekiem. Postępujące owrzodzenie może doprowadzić do perforacji rogówki, której konsekwencją jest stan zapalny wnętrza gałki ocznej. Skutkiem tych powikłań może być utrata oka. Zmianom w rogówce towarzyszy pojawienie się wydzieliny ropnej, obrzęk i przekrwienie spojówki, obrzęk powiek oraz zwężenie szpary powiekowej. Stan zapalny rogówki objawia się bólem, światłowstrętem i zmazanym widzeniem [36,37,39]. Z uwagi na szybko postępującą infekcję, która może doprowadzić do perforacji rogówki i następnie utratę widzenia, leczenie powinno być wprowadzone natychmiast. W początkowym etapie terapii stosowne są antybiotyki o szerokim spektrum, które działają na bakterie Gramm-dodatnie i Gramm-ujemne. W celu uzyskania wysokiego stężenia leku w tkance antybiotyki podawane są miejscowo. Najczęściej stosuje się „terapię podwójną", która polega na połączeniu dwóch wzmocnionych antybiotyków np. cefalosporyn i aminoglikozydów lub cefalsoporyn i antybiotyków glikopeptydowych. Roztwory wodne wzmocnionych antybiotyków nie są dostępne jako preparaty handlowe i przygotowuje się je *ex tempore* w warunkach szpitalnych. Zalecanymi antybiotykami w „terapii podwójnej" są:

- tobramycyna i gentamycyna – roztwory wzmocnione tych antybiotyków otrzymuje się poprzez połączenie 5 mL handlowych kropli do oczu o stężeniu 0,3 % z 2 mL preparatu do iniekcji o stężeniu 40 mg/mL
- cefazolina, cefuroksym i ceftazydym – roztwory o stężeniu około 50 mg/mL przygotowuje się poprzez rozpuszczenie 500 mg liofilizowanego antybiotyku przeznaczonego do sporządzania roztworów lub zawiesin do podawania pozajelitowego w 2,5 mL jałowej wody, a następnie dodaje się 7,5 mL niekonserwowanych jałowych sztucznych łez.
- wankomycyna – roztwory o stężeniu 50 mg/mL otrzymuje się przez rozpuszczenie liofilizowanej postaci antybiotyku w 0,9 % roztworze chlorku sodu lub niekonserwowanym jałowym roztworze sztucznych łez.

Początkowo roztwory wzmocnione antybiotyków podawane są co $^1/_2$ – 1 godzinę, w dzień i w nocy przez 24 – 48 godziny. Po tym czasie, krople podaje się co 2 h przez następne 48 godzin, a następnie 4 razy na dobę przez 1 tydzień. Stwierdzono, że pomimo skuteczności „terapii podwójnej" jest ona obarczona działaniami niepożądanymi, związanymi z zastosowaniem wzmocnionych aminoglikozydów, które mogą powodować martwicę spojówki lub osadzanie się białych precypitatów na rogówce, co może opóźniać leczenie. Po złagodzeniu objawów możliwe jest wprowadzenie monoterapii, która polega na aplikowaniu do worka spojówkowego handlowych kropli z fluorochinolonami. Stosowane są wtedy 0,3 % roztwór ciprofloksacyny lub 0,3 % roztwór ofloksacyny. Pewnym ograniczeniem w stosowaniu fluorchinolonów może być fakt, że wykazują one słabą aktywność przeciw gronkowcom.

W leczeniu infekcji rogówki małe znaczenie ma ogólne podawanie antybiotyków. Jedynie w sytuacji kiedy owrzodzenie przechodzi na twardówkę do terapii włącza się ciprofloksacynę, która podawana jest doustnie w dawce 750 mg 2 razy dziennie przez 7 - 10 dni.

W podawaniu miejscowym praktykuje się iniekcje podspojówkowe, gdzie podaje się jednorazowo 0,5 mL roztworu antybiotyków, tych samych które są stosowane w „terapii podwójnej", z tą różnicą, że przygotowuje się je w rozcieńczeniu czterokrotnie wyższym. Ta droga podawania zarezerwowana jest przede wszystkim dla sytuacji, kiedy pacjent nie przestrzega schematu dawkowania kropli wzmocnionych, podawanych do worka spojówkowego.

Oprócz leków wykazujących aktywność przeciwdrobnoustrojową, w leczeniu infekcji rogówki pomocniczo stosowane są mydriatyki np. 1 % roztwór atropiny lub 1 % roztwór tropikamidu, w celu zapobiegania zrostom tylnym i redukcji bólu spowodowanego skurczem ciała rzęskowego. Ponadto w leczeniu wykorzystuje się również krople z steroidami, których korzyści podawania w infekcji bakteryjnej rogówki nie zostały udowodnione. Steroidy nie powinny być podawane do momentu, kiedy nie została stwierdzona wrażliwość na antybiotyk i wykluczona została infekcja rogówki grzybami lub wirusami. W przeciwnym wypadku podawanie leków sterydowych spowoduje nasilenie objawów infekcji. Zaleca się aby krople ze steroidami były podawane w końcowym etapie leczenia bakteryjnej infekcji rogówki, co zniweluje efekt destrukcji tkanki powodowany głównie przez neutrofile, które są odpowiedzialne za uwalnianie wolnych rodników oraz enzymów proteolitycznych [36,37,38,39,40].

3.2.3. Bakteryjne zakażenie w obrębie oczodołu.

Ropowica oczodołu jest ostrym zapaleniem, której przyczyną są infekcje bakteryjne obejmujące: przednią część położoną przed przegrodą oczodołu lub właściwą jamę oczodołu. Za rozwój stanu zapalnego są odpowiedzialne takie patogeny jak: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* oraz pałeczki z rodziny *Bacillus* i *Clostridium*. Przyczyną zapalenia przedprzegrodowego gałki ocznej jest: uraz bezpośredni, rozszerzenie się zakażeń skóry powiek, czyraki twarzy i ropnie około zębowe u dzieci. Ten typ stanu zapalnego objawia się: bólem głowy i oczodołu, obrzękiem i zaczerwienieniem powiek, przekrwieniem spojówek, opadnięciem powiek oraz ograniczeniem ruchomości gałki ocznej. W objawach występuje również gorączka, leukocytoza i wzrost OB. Zapalenie jamy oczodołu może rozwinąć się po usunięciu ciała obcego z oczodołu oraz może towarzyszyć infekcjom zębów, gruczołu łzowego lub zatok. Może być także następstwem rozszerzenia stanu zapalnego z przedniej części oczodołu. Głównymi objawami postępującej infekcji są: obrzęk i zaczerwienienie powiek, wytrzeszcz gałki ocznej, zaburzenia widzenia, podwyższona temperatura ciała oraz niekiedy wymioty. W leczeniu stanu zapalnego oczodołu stosuje się kloksacylinę i ampicylinę, które podawane są dożylnie. Z uwagi na pojawianie się szczepów opornych zaleca się wdrożenie: cefotaksymu, wankomycyny, klindamycyny lub chloramfenikolu [2,36].

3.2.4. Bakteryjne zapalenie powiek.

Przewlekłe zapalenie brzegów powiek jest najczęściej spowodowane zaburzeniami wydzielania gruczołów łojowych i/lub zakażeniem *Staphylococcus aureus*. Dzieli się je na przednie zapalenie oraz tylne zapalenie brzegów powiek. Oba typy stanu zapalnego prowadzą do: zapalenia spojówek, zapalenia rogówki, nasilenia objawów alergii ocznej i zespołu suchego oka. W przypadku przedniego i tylnego stanu zapalnego brzegów powiek chory ma identyczne objawy, a mianowicie: swędzenie, łzawienie i zaczerwienieniem brzegów powiek oraz średnio nasilony światłowstręt. Przednie łojotokowe zapalenie brzegów powiek charakteryzuje się występowaniem drobnych, żółtych i tłustych łusek, które są zlokalizowane na granicy powiek i rzęs. Usunięcie ich nie powoduje owrzodzenia. W gronkowcowym przednim zapaleniu brzegów powiek występują twarde łuski wokół nasady rzęs, których usunięcie może prowadzić do pojawienia się owrzodzeń. Skutkiem tego może być bliznowacenie brzegu powiek i nieprawidłowy wzrost rzęs lub ich utrata. Tylne zapalenie brzegów powiek jest spowodowane zaburzeniem funkcjonowania gruczołów Meiboma, które są powiększonymi gruczołami łojowymi, produkującymi wydzielinę tłuszczową. Wydzielina ta zapobiega wysychaniu filmu łzowego. Ten typ zapalenia może mieć charakter łojotokowy, gdzie stwierdza się wydzielinę pienistą na brzegach powiek lub postać zastoinową, która objawia się zaczopowaniem ujścia gruczołów. Leczenie przewlekłego zapalenia brzegów polega na wprowadzeniu zabiegów higienicznych oraz antybiotykoterapii [36,39,40]. Zabiegi higieniczne obejmują:

- oczyszczanie podstawy rzęs np. rozcieńczonym szamponem dziecięcym w stosunku 1:4, co ułatwia wyeliminowanie bakterii i ich toksyn, które mogą prowadzić do owrzodzenia rogówki
- w zapaleniu tylnym stosuje się ciepłe kompresy i masaż powiek, co ułatwia pozbycie się zalegającej wydzieliny

W leczeniu farmakologicznym zastosowanie mają:

- maści antybiotykowe z chloramfenikolem, bacytracyną lub erytromycyną
- krople do oczu zawierające fusydek sodu, bacytracynę lub chloramfenikol
- azytromycyna podawana doustnie w dawce 500 mg przez 3 dni
- w przypadku tylnego zapalenia brzegów powiek stosowana jest długotrwała antybiotykoterapia : oksytetracykliną, doksycykliną lub erytromycyną

3.2.5. Zapalenie wnętrza gałki ocznej wywołane zakażeniem bakteryjnym.

Jest to typ zapalenia, które obejmuje całą błonę naczyniową, komorę przednią oraz komorę szklistą. Wśród typów zapaleń wnętrza gałki ocznej, których przyczyną są infekcje bakteryjne wyróżnia się [36,39]:

- ostre pooperacyjne bakteryjne zapalenie wewnątrzgałkowe
- późne pooperacyjne bakteryjne zapalenie wewnątrzgałkowe
- zapalenie wewnątrzgałkowe związane z zakażeniem poduszki filtracyjnej
- pourazowe bakteryjne zapalenie wewnątrzgałkowe
- endogenne bakteryjne zapalenie wewnątrzgałkowe

Pooperacyjne zapalenie wnętrza gałki ocznej jest to ciężkie powikłanie, które spowodowane jest przenikaniem patogenu z powiek, z worka spojówkowego lub układu łzowego do wnętrza oka. Źródłem zakażenia są: instrumenty chirurgiczne, zainfekowane krople lub płyny do przepłukiwania oka, powietrze na sali operacyjnej, chirurg, czy też wszczepiana soczewka w operacji zaćmy.

Ostre pooperacyjne zapalenie wewnątrzgałkowe rozwija się pomiędzy 1 a 14 dniem po operacji. Infekcję tą wywołują: *Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp. i *Proteus* sp. Stan zapalny objawia się silnym bólem oka, spadkiem ostrości widzenia, pojawieniem się wysięku w ciele szklistym i ropy w komorze przedniej oka oraz przymgleniem rogówki.

Późne pooperacyjne bakteryjne zapalenie wewnątrzgałkowe rozwija się w okresie od 4 tygodni do kilku lat po operacji zaćmy. Objawia się ono pogorszeniem widzenia, pojawieniem się osadów w rogówce i mętnym wysiękiem w ciele szklistym. Zakażenie najczęściej wywoływane jest przez *Staphylococcus epidermidis, Actinomyces israelii, Corynebacterium* sp., *Propionibacterium acnes*.

Zapalenie wewnątrzgałkowe związane z zakażeniem poduszki filtracyjnej są spowodowane zakażeniami występującymi po przeciwjaskrowym zabiegu filtracyjnym. Wśród patogenów wywołujących ten typ zakażenia najczęściej stwierdza się obecność *Haemophilus influenzae, Streptococcus* sp. i *Staphylococcus* sp.. Infekcja może ograniczyć się tylko do poduszki filtracyjnej lub rozprzestrzenić się wewnątrz gałki ocznej. Zapalenie poduszki filtracyjnej powoduje uczucie niewielkiego dyskomfortu i zaczerwienienie oka. Nie stwierdza się tutaj zapalenia przedniego odcinka błony naczyniowej. W infekcji, która obejmuje oprócz poduszki filtracyjnej również wnętrze

gałki ocznej, obserwuje się pogorszenie widzenia, ból i zaczerwienie oka. Stanem zapalnym w tym wypadku objęte są błona naczyniowa oraz ciało szkliste.

Pourazowe wewnątrzgałkowe bakteryjne zapalenie wewnątrzgałkowe powodowane jest obecnością ciała obcego, które powoduje uraz gałki ocznej. Charakteryzuje się takimi samymi objawami jak ostre pooperacyjne zapalenie wewnątrzgałkowe. Głównymi patogenami wywołującymi ten stan zapalny są *Staphylococcus* sp. i *Bacillus* sp.

Endogenne bakteryjne zapalenie wewnątrzgałkowe rozwija się w sytuacji, kiedy bakterie przenikają z tkanek poprzez barierę krew – oko do tkanki oka. Ten typ zapalenia może wystąpić u osób chorych na : cukrzycę, choroby serca, nowotwory, zapalenie płuc, ropnie wątroby, zapalenie dróg moczowych oraz stany zapalne skóry i tkanki podskórnej. Do głównych objawów endogennej infekcji bakteryjnej wnętrza gałki ocznej należą: ból oka i głowy, światłowstręt, obecność mętów, obrzęk powiek i rogówki, wytrzeszcz oka, zapalenie błony naczyniowej z wysiękiem włóknikowym i poziomem ropy. Może pojawić się również gorączka oraz dreszcze. Źródłem zakażenia są: *Klebsiella* sp., *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Neisseria meningitidis*, *Bacillus cereus* i *Haemophilus influenzae*.

W leczeniu zapalenia wnętrza gałki ocznej stosowane są preparaty podawane miejscowo oraz antybiotykoterapia ogólna. W przypadku miejscowej drogi aplikacji zastosowanie mają:

- podanie antybiotyku do ciała szklistego – jest to główna metoda leczenia i zastosowanie tutaj mają iniekcje amikacyny, wankomycyny lub ceftazydymu.
- okołogałkowe podanie antybiotyku – wykonuje się w formie iniekcji podspojówkowej ceftazydymu w polaczeniu z wankomycyną lub cefuroksymu w połączeniu z gentamycyną. Okołogałkowo podawane są również steroidy: deksametazon i triamcynolon.
- krople do oczu – mają zastosowanie w sytuacji gdy zakażeniem objęta jest rogówka. Miejscowo podawane są wzmocnione krople z wankomycyną, ceftazydymem, cefuroksymem i ofloksacyną. Pomocniczo stosowane są 0,1 % krople z deksametazonem.

W antybiotykoterapii ogólnej preparatami podawanymi doustnie są : fluorochinolony, klarytromycyna, amoksycylina w połączeniu kwasem klawulonowym, natomiast w formie iniekcji dożylnych stosowane są amikacyna i cefalosporyny.

3.2.6. Bakteryjne zapalenie gruczołu łzowego.

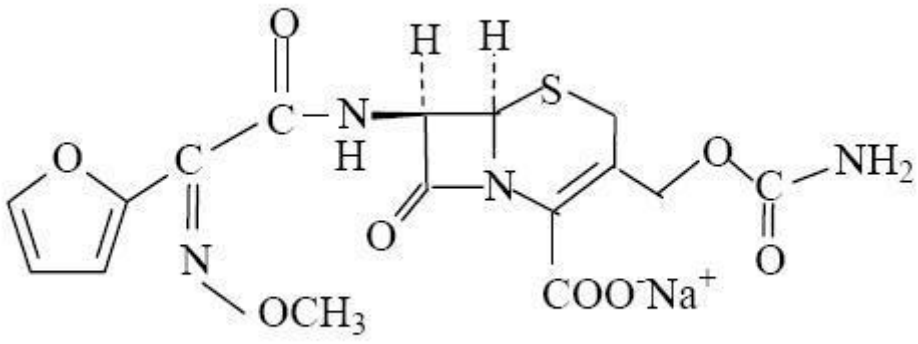
Przyczyną zapalenia gruczołu łzowego jest infekcja wywołana głównie przez *Staphylococcus* sp. oraz przez *Streptococcus pneumoniae.* Stan zapalny objawia się obrzękiem i zaczerwienieniem powieki górnej, bólem oraz podwójnym widzeniem. W leczeniu wykorzystuje się antybiotyki podawane zarówno ogólnie, jak i miejscowo, które dobiera się w zależności od wyników antybiogramu [2].

3.2.7. Zapalenie woreczka łzowego.

Zapalenie woreczka łzowego może występować u noworodków oraz u dorosłych, po 35 roku życia. Stan ten jest wywoływany zwężeniem lub niedrożnością dróg łzowych, które powodują zaleganie łez będących pożywką dla *Staphylococcus* sp. i *Streptococcus* sp. lub *Pseudomonas aeruginosa*. U noworodków objawy zapalne mogą pojawić się po 2 – 4 tygodniach po narodzinach i leczy się je poprzez masaże woreczka łzowego, płukanie dróg łzowych oraz podawanie do worka spojówkowego kropli z erytromycyną. U dorosłych podaje się ogólnie cefalosporyny, natomiast miejscowo krople z aminoglikozydem [2].

4. Cefuroksym sodowy.

4.1. Właściwości fizykochemiczne [41,42,43].



Rycina 2. Wzór strukturalny cefuroksymu sodowego.

Nazwa chemiczna:

Sodu(6R,7R)-3-[(karbamoiloksy)metylo]-7-[[(Z)-2-(furan-2-ylo)(metoksyimino) acetylo]amino]-8-okso-5-tia-1-azabicyklo[4.2.0]okt-2-eno-2-karboksylan

Wzór sumaryczny : $C_{16}H_{15}N_4NaO_8S$

Masa cząsteczkowa : 446,4

Zawartość: od 96,0 % do 102,0 % (w przeliczeniu na bezwodną substancję)

Wygląd : biały lub prawie biały proszek, słabo higroskopijny

Rozpuszczalność : bardzo łatwo rozpuszczalny w wodzie i roztworach buforowanych, rozpuszczalny w metanolu, bardzo trudno rozpuszczalny w etanolu, nierozpuszczalny w acetonie, chloroformie i toluenie.

pH roztworu substancji o stężeniu 0,1 g/mL: od 5,5 do 8,5

4.2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa i zastosowanie w lecznictwie.

Cefuroksym sodowy posiada szeroki zakres aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec bakterii Gram- dodatnich oraz Gram-ujemnych, w tym wytwarzających β-laktamazy. Jest skuteczny wobec: *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Haemophilus influenzae, Escherichia coli, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Moraxella catarrhalis, Klebsiella* sp., *Proteus mirabilis, Shigella* sp., *Yersinia* sp. i *Salmonella* sp. Opornymi na cefuroksym są : *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa* oraz wiele szczepów *Serratia* sp. [44,45,46].

Cefuroksym sodowy podawany pozajelitowo ma zastosowanie w [45] :

- ostrym zapaleniu ucha
- infekcji kości i stawów
- zapaleniu opon mózgowych
- zapaleniu gardła i migdałków
- infekcjach dróg oddechowych
- posocznicy
- infekcji skóry
- infekcji dróg moczowych

Oprócz iniekcji dożylnych, domięśniowych oraz wlewów dożylnych duże znaczenie ma miejscowe podawanie cefuroksymu sodowego w infekcji struktur oka, w postaci roztworów wzmocnionych oraz iniekcji podspojówkowych i dokomorowych. Ponadto wspomniane miejscowe wstrzyknięcia profilaktycznie są wykonywane w trakcie leczenia operacyjnego zaćmy. Przed zabiegiem podawany jest roztwór cefuroksymu sodowego w formie wstrzyknięcia podspojówkowego (50 mg w 0,5 mL 0,9 % roztworu chlorku sodu) oraz w formie wstrzyknięcia do komory oka (1 mg w 0,1 mL 0,9 % roztworu chlorku sodu). Udowodniono, że podanie dokomorowe jest bezpieczne i prowadzi do zmniejszonej częstotliwości występowania pooperacyjnego zapalenia wnętrza gałki oka, w porównaniu do podania podspojówkowego cefuroksymu sodowego [47,48]. Nie wykazano również aby dokomorowe podawanie cefuroksymu prowadziło do pooperacyjnego pogrubienia plamki żółtej [49].

Przeprowadzono badania porównawcze antybiotyków: wankomycyny, teikoplaniny i cefuroksymu pod kątem hamowania adhezji bakterii na powierzchnię syntetycznych soczewek stosowanych, w chirurgicznym zabiegu leczenia zaćmy. Stwierdzono, że efekt cefuroksymu na proces hamowania adhezji bakterii był znacząco lepszy w porównaniu z teikoplaniną i wankomycyną. Bakteryjna adhezja jest istotnym czynnikiem w zjadliwości bakterii. Badanie było przeprowadzone na szczepach bakterii *Staphylococcus epidermidis*, które są najczęstszą przyczyną pooperacyjnych zapaleń oczu [50]. Analiza statystyczna przeprowadzona przez Europejskie Towarzystwo Chirurgów Zaćmy i Chirurgii Refrakcyjnej wykazała, że 55 % lekarzy chirurgów podawało prewencyjnie w postaci wstrzyknięć dokomorowych cefuroksym sodowy, 37 % respondentów nie stosowało żadnych antybiotyków, a pozostałe 8 % wykorzystywało do wstrzyknięć dokomorowych: gentamycynę, wankomycynę i ceftazydym. Jako główny powód niestosowania iniekcji dokomorowych cefuroksymu wymieniano: ryzyko związane z nieodpowiednim przygotowaniem rozcieńczenia antybiotyku podczas przygotowania leku do wstrzyknięć oraz brak handlowej postaci antybiotyku przeznaczonej do tego celu. Z pośród lekarzy chirurgów stosujących profilaktycznie przed zabiegiem chirurgicznym dokomorowe podawanie cefuroksymu, tylko 33 % wybierało inny antybiotyk w sytuacji, kiedy pacjent miał udokumentowaną alergię na penicyliny [51].

4.3. Farmakokinetyka cefuroksymu sodowego.

Cefuroksym sodowy słabo jest wchłaniany w przewodzie pokarmowym, z uwagi na fakt, że w fizjologicznym pH jest w znacznym stopniu zdysocjowany i słabo rozpuszczalny w lipidach. Po podaniu doustnym w moczu pojawia się około 1 % przyjętej dawki [52]. Objętość dystrybucji cefuroksymu sodowego wynosi od 12 do 18 litrów. Wiąże się on z białkami surowicy w 33 %. Po podaniu dożylnym cefuroksymu sodowego w dawce 500 mg, stężenie w surowicy powyżej 8 µg/mL występowało przez 100,3 min (± 18,3 min), natomiast po podaniu dawki 750 mg takie stężenie utrzymywało się przez 144,5 min (± 19,8 min). Takie wartości uzyskano przy klirensie kreatyniny wynoszącym 150 mL/min/1,73 m^2. Okres półtrwania cefuroksymu sodowego wynosił 65,7 min. W ciągu 24 h w moczu wykryto 95,1 % podanej dawki. [52]. Biologiczny okres półtrwania, a tym samym stężenie cefuroksymu sodowego w osoczu, są ściśle zależne od funkcjonowania nerek. Zaobserwowano, że po podaniu pojedynczej dawki 750 mg dożylnie, stężenie leku w osoczu powyżej 8 µg/mL

utrzymywało się przez: 3 h u osób z klirensem kreatyniny między 60 a 120 mL/min/1,73 m^2, 6 h w grupie osób z klirensem kreatyniny wynoszącym od 20 do 59 mL/min/1,73 m^2 i 30 h u osób z klirensem kreatyniny poniżej 20 mL/min/1,73 m^2. Biologiczny okres półtrwania wynosił odpowiednio w poszczególnych grupach probantów odpowiednio: 1,7 h, 2,4 h i 17,6 h. Stwierdzono, że dawki u osób z klirensem kreatyniny wynoszącym mniej niż 20 mL/min/1,73 m^2 powinny być zmniejszone [53].

Cechą charakterystyczną cefuroksymu sodowego jest zdolność do przenikania przez barierę krew-mózg, co umożliwia zastosowanie tej cefalosporyny w zapaleniu opon mózgowych wywoływanych przez: *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis* oraz *Staphylococcus aureus* [45]. Stężenie cefuroksymu w płynie mózgowo-rdzeniowym jest ściśle uzależnione od stopnia nasilenia stanu zapalnego. Po podaniu jednorazowo dożylnie 1,5 g cefuroksymu sodowego w ciężkim stanie zapalnym opon mózgowych, stężenie w płynie mózgowo-rdzeniowym wynosiło 1,5 – 3,7 mg/L, w zapaleniu o nasileniu lekkim do umiarkowanego stężenie wynosiło 0,1 – 2 mg/L. Bez stanu zapalnego u $^1/_3$ chorych nie udało się wykryć antybiotyku w płynie mózgowo rdzeniowym, podczas gdy u pozostałych stężenie wynosiło 0,2 – 1 mg/L [1].

4.4. Preparaty handlowe cefuroksymu sodowego.

Do preparatów handlowych cefuroksymu sodowego do podawania pozajelitowego, które są zarejestrowane w Polsce należą [54]:

- BIOFUROKSYM (Bioton, PL) proszek do przygotowywania zawiesiny do wstrzyknięć domięśniowych i roztworu do wstrzyknięć dożylnych - 250 mg, 500 mg, 750 mg/fiol. oraz proszek do przygotowywania roztworu do wstrzyknięć dożylnych – 1,5 g/fiol.
- PLIXYM (Pliva Kraków, PL) proszek do przygotowania zawiesiny do wstrzyknięć domięśniowych i roztworu do wstrzyknięć dożylnych - 250 mg, 500 mg, 750 mg/fiol. oraz proszek do przygotowywania roztworu do wstrzyknięć i wlewów dożylnych – 1,5 g/fiol.
- TARSIME (Polfa Tarchomin, PL) proszek do przygotowania zawiesiny do wstrzyknięć domięśniowych i roztworu do wstrzyknięć dożylnych - 750 mg/fiol. oraz proszek do przygotowywania roztworu do wstrzyknięć i wlewów dożylnych – 1,5 g/fiol.

- ZINACEF (GlaxoWellcome, GB) proszek do przygotowania zawiesiny do wstrzyknięć domięśniowych i roztworu do wstrzyknięć dożylnych – 250 mg/fiol. Proszek do przygotowania zawiesiny do wstrzyknięć domięśniowych, roztworu do wstrzyknięć i wlewów dożylnych - 750 mg/fiol. oraz proszek do przygotowywania roztworu do wstrzyknięć i wlewów dożylnych - 1,5 g/fiol.

Wszystkie preparaty cefuroksymu sodowego dostępne są w formie jałowego liofilizowanego proszku w fiolkach, który w zależności od drogi podania przygotowuje się w następujący sposób [55]:

- podanie domięśniowe – zawartość fiolki należy uzupełnić jałową wodą do wstrzykiwań, w takiej ilości aby uzyskać postać zawiesiny o stężeniu około 220 mg cefuroksymu sodowego na 1 mL.
- podanie dożylne – zawartość fiolki należy uzupełnić wodą w celu uzyskania roztworu cefuroksymu sodowego o stężeniu około 90 mg/mL. Wstrzyknięcie dożylne wykonuje się od 3 do 5 minut.
- wlew dożylny – stężenie cefuroksymu sodowego podawanego we wlewach wynosi około 7,5 mg/mL lub 15 mg/mL. Antybiotyk (750mg lub 1,5 g) rozpuszcza się w 100 mL 5 % roztworu dekstrozy lub 0,9 % roztworu chlorku sodu. Wlew dożylny wykonuje się od 15 do 60 minut.

4.5. Trwałość cefuroksym sodowego w roztworach wodnych.

Badania trwałości cefuroksymu sodowego prowadzono głównie w wlewach dożylnych, gdzie antybiotyk rozpuszczano w 0,9 % roztworze chlorku sodu, 5 % roztworze dekstrozy lub 5 % roztworze glukozy. Celem analizy było określenie wpływu: temperatury przechowywania, zastosowanych rozpuszczalników, stężenia antybiotyku oraz rodzaju opakowania na stabilność antybiotyku w sporządzonych roztworach.

Optymalne pH dla trwałości cefuroksymu sodowego w roztworach wodnych wynosiło od 4 do 7 [56]. Gupta i współpr. określili optymalne pH dla stabilności antybiotyku między 4,5 a 7,3 [57]. Przy niższych wartościach pH, wynoszących 3,5 lub mniej dochodzi do hydrolizy pierścienia β-laktamowego, natomiast w roztworach o wyższym pH następuje hydroliza łańcucha bocznego antybiotyku w pozycji 3, z utworzeniem descarbomylocefuroksymu, który ma zachowany pierścień β-laktamowy [58,59].

Müller i współpr. badali wpływ temperatury przechowywania oraz nowego opakowania wykonanego z poliolefin (Biofine ®) na trwałość cefuroksymu sodowego o stężeniu 7,5 mg/mL w 0,9 % roztworze chlorku sodu. Stabilność cefuroksymu sodowego była identyczna w opakowaniu ze szkła, jak i z poliolefin. Kluczową rolę odegrała temperatura przechowywania sporządzonych roztworów. W temperaturze pokojowej ponad 10 % spadek zawartości antybiotyku nastąpił w ciągu 24 h, natomiast trwałość cefuroksymu sodowego w roztworach przechowywanych w temperaturze 2 – 8 °C wyznaczono na 7 dni [60]. Badano również wpływ zastosowanego rozpuszczalnika oraz stężenia antybiotyku na trwałość sporządzonych roztworów. Wykonano roztwory cefuroksymu sodowego o stężeniu 10 mg/mL i 5 mg/mL w 0,9 % chlorku sodu oraz 5 % roztworze dekstrozy. Stwierdzono, że trwałość cefuroksymu sodowego nie zależała od stężenia antybiotyku w roztworze, czy też rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika, ale tylko wyłącznie od temperatury przechowywania. Trwałość określono metodą HPLC i zdefiniowano jako czas w którym ponad 10 % antybiotyku uległo rozkładowi. Dla roztworów przechowywanych w temperaturze 25 °C ± 1 °C wynosiła ona 24h, natomiast trwałość roztworów przechowywanych w temperaturze 5 °C ± 1 °C wynosiła przynajmniej 30 dni [57]. Metodą HPLC określono również trwałość roztworów cefuroksymu sodowego o stężeniu 15 mg/mL w 5% roztworze dekstrozy, które były przechowywane w workach z polichlorku winylu w temperaturze 4ºC przez okres jednego miesiąca. Trwałość tych roztworów wynosiła 13 dni [61]. Roztwory o takim samym stężeniu antybiotyku, otrzymane poprzez rozpuszczenie cefuroksymu sodowego w 5 % roztworze dekstrozy i przechowywane w workach poliolefinowych w temperaturze 4ºC miały trwałość 31 dni [62]. Faouzi i współpr. badali również trwałość cefuroksymu sodowego w 5% roztworze glukozy i 0,9 % roztworze chlorku sodu, przechowywanych w workach z polichlorku winylu. Wykazano, że roztwory antybiotyku zachowały trwałość podczas 24–godzinnego przechowywania w temperaturze pokojowej i podczas 7-dniowego przechowywania w temperaturze 4ºC. Ponadto wykazano brak wpływu użytego rozpuszczalnika na trwałość cefuroksymu sodowego w sporządzonych roztworach [63].

Badano również wpływ zamrażania roztworów do wlewów z cefuroksymem, a następnie odmrażania za pomocą mikrofal na stabilność antybiotyku w sporządzonych roztworach. Roztwory cefuroksymu sodowego o stężeniu 1,5 % w 5 % roztworze dekstrozy umieszczono w workach poliolefinowych, zamrożono i przechowywano w temperaturze – 20 °C przez 98 dni, a następnie rozmrożono za pomocą mikrofal przy

cyklu lekkim - 270 W oraz przy cyklu mocnym - 800 W. Po rozmrożeniu roztwory przechowywano w temperaturze 4 °C i badano zmiany zawartości antybiotyku. Trwałość określona ponad 10 % spadkiem zawartości cefuroksymu wynosiła 23 dni dla cyklu lekkiego rozmrażania oraz 21 dni dla cyklu mocnego rozmrażania. Wartości te uzyskano dla pojedynczo zamrożonych worków, natomiast w próbie gdzie worki były mrożone w zbiorczym opakowaniu trwałość antybiotyku wynosiła odpowiednio do cyklu rozmrażania: 21 dni i 18 dni [64]. Podobnie, poddano analizie 1,5 % roztwory cefuroksymu sodowego wykonane na 5 % roztworze glukozy, dla których opakowaniem były worki z polichlorku winylu. Sporządzone płyny do wlewów zamrożono i przechowywano przez 3 miesiące w temperaturze - 30 °C. Po tym czasie próby rozmrożono w mikrofali o mocy wyjściowej 270 W i poddano przechowywaniu w temperaturze 4 °C przez 30 dni, podczas którego dokonano analizy zmiany zawartości antybiotyku. Trwałość cefuroksymu sodowego w sporządzonych płynach do wlewów w tym przypadku wynosiła 15 dni [65].

Z uwagi na zastosowanie cefuroksymu sodowego w miejscowym leczeniu infekcji oczu pojawiły się prace związane z trwałością antybiotyku w roztworach wodnych przeznaczonych do tego celu. Oldham i współpr. badali trwałość za pomocą metody HPLC w 5 % roztworach wodnych cefuroksymu sodowego sporządzonych z preparatu Zinacef, suchej liofilizowanej postaci przeznaczonej do iniekcji dożylnych i domięśniowych oraz do wlewów dożylnych. Stwierdzono, że krople z cefuroksymem sodowym zachowują trwałość przez 24 h podczas przechowywania w temperaturze pokojowej oraz 21 dni w trakcie przechowywania w temperaturze 2 °C podczas symulowanej aplikacji przez pacjenta. Ponadto świeżo sporządzone roztwory zamrożono i przechowywano w temperaturze – 30 °C przez 12 miesięcy, następnie po tym okresie czasu dokonano rozmrożenia i zbadano stabilność antybiotyku w trakcie przechowywania w temperaturze 2 °C oraz 8 °C. Wykazano, że 5 % roztwory z cefuroksymem sodowym przechowywane w temperaturze 2 °C były trwałe przez 21 dni, podczas gdy roztwory przechowywane w temperaturze 8 °C były trwałe 14 dni [66]. Hebron i współpracownicy badali trwałość za pomocą metody HPLC 5 % roztworów cefuroksymu sodowego w preparatach handlowych sztucznych łez oraz wodzie do iniekcji. Okazało się, że tylko roztwory antybiotyku w preparacie Sno Tears oraz w wodzie do iniekcji zachowują trwałość 28 dni podczas przechowywania w temperaturze 4 °C [67]. Kodym i współpracownicy zbadali aktywność przeciwdrobnoustrojową cefuroksymu w 1 % kroplach sporządzonych w buforze

cytrynianowym pH 6,15 - 6,20, w formulacjach ze zwiększoną lepkością poliwinyloalkoholem i konserwowanych tiomersalem w stężeniu 0,002 % lub boranem fenylortęciowym w stężeniu 0,001 % w skojarzeniu z alkoholem β- fenyloetylowym w stężeniu 0,4 %. Po 30 dniach przechowywania kropli w temperaturze 4 ºC aktywność przeciwdrobnoustrojowa cefuroksymu wyznaczona metodą cylinderkowo-płytkową według Farmakopei Polskiej VI, z zastosowaniem szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus ATCC 6538P* utrzymywała się na 99,63 % poziomie w odniesieniu do dnia wykonania kropli [68].

Trwałość cefuroksymu sodowego badano również w żelu do wstrzyknięć dokomorowych umieszczonym w ampułkostrzykawce, który stanowił 0,2 % roztwór hialuronianu sodu w 0,9 % roztworze chlorku sodu. Zawartość antybiotyku w opracowanej postaci leku wynosiła 10 mg/mL. Żel do wstrzykiwań przeznaczony był do profilaktycznego podawania w trakcie zabiegu operacyjnego leczenia zaćmy. Jako próbę odniesienia w badaniach trwałości, zastosowano roztwór cefuroksymu sodowego o tym samym stężeniu w 0,9 % roztworze chlorku sodu, który został umieszczony w ampułkostrzykawce. W tracie przechowywania w temperaturze 4 °C, ponad 90 % zawartość antybiotyku w żelu do wstrzyknięć oraz w roztworze odniesienia utrzymywała się przez 21 dni, podczas gdy w temperaturze 25 °C ponad 10 % spadek zawartości cefuroksymu sodowego w badanych próbach nastąpił w ciągu 2 dni [69]. Podkreślono tutaj, że uzyskane wyniki trwałości cefuroksymu w 0,9 % roztworze chlorku sodu nie są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, gdzie Gupta i współpr. wykazali, że trwałość roztworów, o takim samym składzie, przechowywanych w temperaturze 5 °C ± 1 °C wynosiła przynajmniej 30 dni [57,69].

4.6. Technologiczne aspekty sporządzania kropli do oczu z cefuroksymem sodowym.

Dość szeroko stosowane w lecznictwie zamkniętym, zwłaszcza w bakteryjnej infekcji rogówki, wzmocnione krople do oczu z cefuroksymem sodowym o stężeniu 5 % stanowią roztwory antybiotyku: w wodzie do iniekcji, czasami z dodatkiem niekonserwowanych jałowych sztucznych łez, w 0,9 % roztworze chlorku sodu oraz w 5 % roztworze glukozy [34,36]. Tak przygotowane krople mają ograniczone zastosowanie, z uwagi na brak środków konserwujących w ich składzie, co powoduje że po pierwszym użyciu przez pacjenta ważność takiego preparatu wynosi 24 h. Biorąc pod uwagę schemat dawkowania, który w ostrej infekcji rogówki przewiduje podawanie

kropli wzmocnionych co ½ - 1 h przez 24 – 48 h, następnie co 2 h przez 48 h, a po opanowaniu ostrej fazy infekcji 4 razy dziennie przez 1 tydzień, niemożliwe jest przeprowadzenie pełnej terapii przy użyciu jednego opakowania niekonserwowanych kropli. Celowe więc stało się opracowanie kropli zawierających środki konserwujące których obecność zapobiegałaby wtórnemu zanieczyszczeniu mikrobiologicznemu kropli, co tym samym wydłużałyby ich datę ważności po pierwszym otwarciu opakowania.

Badania zgodności środków konserwujących z antybiotykiem wykazały, że cefuroksym w roztworach wodnych był niezgodny z chlorkiem benzalkoniowym w stężeniu powyżej 0,002 % w kroplach 5 % i w stężeniu 0,005 % w kroplach 1 % [67,68], z tiomersalem w stężeniu powyżej 0,003 % w kroplach 1 % [68], z octanem fenylortęciowym w stężeniu 0,002 % w kroplach 5 % [70] oraz z octanem chloroheksydyny, której niezgodność z cefuroksymem występowała w stężeniach 0.02 % w kroplach 5 % [71] oraz w stężeniu 0.01 % w kroplach 1 % [68]. Interakcje te uwidoczniały się wystąpieniem opalizacji lub strątem po połączeniu środków konserwujących z antybiotykiem. Wyjątkiem był tutaj octan fenylortęciowy, który po połączeniu z cefuroksymem tworzył klarowne roztwory, w których jednak następował szybki rozkład środka konserwującego, powodujący spadek jego stężenia poniżej efektywnego działania przeciwbakteryjnego [70,71].

Kodym i współpr uzasadnili zastosowanie w 1 % kroplach z cefuroksymem: boranu fenylortęciowego w stężeniu 0,001 % oraz alkoholu β-fenyloetylowego w stężeniu 0,4 %, które nie dawały interakcji fizycznej z antybiotykiem i wykazywały skuteczność przeciwdrobnoustrojową, która została potwierdzona testem konserwacji przeprowadzonym według Farmakopei Polskiej VI, przy zastosowaniu szczepów bakterii i grzybów testowych: *Staphylococcus aureus ATCC 6538, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, Candida albicans ATCC 10231* i *Aspergillus niger ATCC 16404* . Połączenie tiomersalu w stężeniu 0,002 % z alkoholem β-fenyloetylowym w stężeniu 0,4 % zapewniało fizyczną zgodność z 1 % roztworem cefuroksymu sodowego, jednak nie spełniło wymogów odnośnie testów konserwacji zawartych w Farmakopei Polskiej VI [68,72,73].

Jak wspomniano wcześniej, zastosowanie roztworów wodnych o zwiększonej lepkości wydłuża czas kontaktu leku z powierzchnią rogówki do 30 minut [32]. Po opanowaniu ostrej fazy infekcji rogówki, zastosowanie roztworów o zmodyfikowanej lepkości przy dawkowaniu kropli 4 razy dziennie przez tydzień, uczyniłoby terapię bardziej

efektywną. Z pośród handlowych preparatów tzw.„ sztucznych łez", w których rozpuszczano cefuroksym sodowy w celu uzyskania kropli o zmodyfikowanej lepkości o stężeniu 5 %, wytypowano dwa: Sno Tears oraz Hypromellose PF [67]. Preparat Sno Tears jest roztworem wodnym alkoholu poliwinylowego i hydroksyetylocelulozy, który jako środek konserwujący zawiera chlorek benzalkoniowy o stężeniu 0,004 %. Z uwagi na wysokie stężenie chlorku benzalkoniowego, które może być przyczyną interakcji fizycznej z antybiotykiem, nie ma zgodności wśród autorów co do wykorzystania tego preparatu handlowego jako vehiculum do sporządzania 5 % kropli z cefuroksymem sodowym [66,67,71]. Krople wykonane na handlowym niekonserwowanym roztworze hydroksypropylometylocelulozy (Hypromellose PF), przechowywane w temperaturze 4 °C, pomimo zachowanej trwałości fizykochemicznej przez 14 dni, miały ograniczone zastosowanie z uwagi na brak środków konserwujących .

W badaniach nad technologią sporządzania 1 % kropli do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych wykazano, że: hydroksyetyloceluloza metyloceluloza, polialkohol winylowy oraz poliwinylopyrolidon mogą być brane pod uwagę jako środki zwiększające lepkość, ponieważ wykazują zgodność farmaceutyczną z antybiotykiem, w stężeniach pozwalających na uzyskanie kropli o zwiększonej lepkości. Ponadto poddano analizie wpływ wyjaławiania termicznego w autoklawie na lepkość roztworów wyżej wymienionych polimerów. Udowodniono, że najbardziej stabilnym termicznie polimerem był polialkohol winylowy [68,72].

Biorąc pod uwagę fakt, że najbardziej optymalne pH dla trwałości cefuroksymu sodowego mieściło się w granicach między 4 a 7 [56] lub jak inni autorzy podają między 4,5 a 7,3 [57], kluczowe było włączenie do składu 1 % kropli recepturowych z cefuroksymem sodowym buforu cytrynianowego o pH 6,15 – 6,20 , który wykazał zgodność farmaceutyczną z antybiotykiem. Zrezygnowano natomiast z buforu fosforanowego, mimo braku interakcji farmaceutycznej z cefuroksymem sodowym, ponieważ bufor nie był klarowny po wyjałowieniu termicznym w autoklawie [68,72].

III. CEL PRACY

1. Opracowanie technologii sporządzania 1 % i 5 % (w/w) kropli do oczu z cefuroksymem sodowym w czterech wersjach recepturowych, o trwałości nie krótszej niż 14 dni, tj. o trwałości określonej czasem, w którym stężenie cefuroksymu w kroplach przechowywanych w temperaturze 4 °C i chronionych przed światłem będzie utrzymywało się na poziomie nie niższym jak 90 % początkowego stężenia.
2. Opracowanie i zwalidowanie metody ilościowego oznaczania cefuroksymu sodowego w zaprojektowanych wersjach kropli metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).
3. Zbadanie wpływu niezbędnych w składzie kropli wybranych substancji pomocniczych (rozpuszczalników, substancji buforujących, substancji zwiększającej lepkość oraz substancji konserwujących), temperatury przechowywania oraz stężenia cefuroksymu na właściwości fizyczne oraz trwałość 1 % i 5 % kropli recepturowych z cefuroksymem sodowym.
4. Opracowanie składu i sposobu sporządzania rozpuszczalników, przeznaczonych do 1 % i 5% „przemysłowych" kropli z cefuroksymem sodowym z określeniem ich trwałości, testem przyśpieszonym i testem długoterminowym zgodnie z wytycznymi ICH oraz analizą skuteczności przeciwdrobnoustrojowej, w przypadku wersji konserwowanych.
5. Określenie trwałości cefuroksymu sodowego w 1 % i 5 % „przemysłowych" kroplach z cefuroksymem sodowym, sporządzonych przy zastosowaniu rozpuszczalników świeżo sporządzonych oraz poddanych badaniom trwałości testem przyspieszonego starzenia wg ICH (czas przechowywania 6 miesięcy, temperatura 40 °C ± 2 °C, wilgotność względna 75 %).

IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Materiał do badań.

- Roztwory substancji pomocniczych przeznaczonych do sporządzania 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych i „przemysłowych". W tym :
  - bufory cytrynianowe pH 6,05 - 6,28
  - roztwór alkoholu poliwinylowego (PVA) o lepkości 42,31 mPa • s
  - roztwory konserwantów: 0,04 % (w/w) roztwór boranu fenylortęciowego i alkohol β-fenyloetylowy
- Rozpuszczalniki przeznaczone do przemysłowej produkcji 1 % i 5 % (w/w) kropli do oczu z cefuroksymem sodowym, zarówno świeżo sporządzone, jak i poddane testowi przyspieszonego starzenia przez okres 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 ^{0}C/75 RH ± 5 RH oraz poddane długotrwałemu testowi stabilności przez okres 12-stu miesięcy w temperaturze 25 ^{0}C/60 RH ± 5 RH.
- Krople do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych o stężeniu 1 % i 5% (w/w) oraz krople do oczu z cefuroksymem sodowym o tym samym stężeniu w wersjach „przemysłowych", sporządzone na świeżo wykonanych rozpuszczalnikach oraz na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej przyśpieszonemu starzeniu przez okres 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 ^{0}C/75 RH ± 5 RH.

2. Odczynniki użyte do badań.

- BIOFUROKSYM® (Cefuroximum) 1,5 g
  numer serii: 2010907A, 2060208A, 2010409A
  pozwolenie na dopuszczenie do obrotu: R/0595
  producent: BIOTON Sp. z o.o. Warszawa

- Alkohol poliwinylowy m. cz. 72.000
  numer serii: 101910810
  numer kat.: 73489242
  producent: POCH S.A. Gliwice

- Boran fenylortęciowy (Phenylmercuric borate)
  numer kat.: 836613
  producent: The Sigma – Aldrich Library of Rare Chemicals

- Alkohol ß-fenyloetylowy (2-Phenyloethanol)
  numer serii: 114K0078
  producent: Sigma-Aldrich Chemie GmbH

- Kwas cytrynowy jednowodny cz.d.a **(**Citric acid monohydrate pure p.a.)
  numer serii: 0296/10/05
  numer kat.: 53821018
  producent: POCH S.A. Gliwice

- Sodu cytrynian dwuwodny (Natrii citras, tri- Sodium citrate dihydrate) FPVI
  numer serii: 0713/07/05
  numer kat.: 795780112
  producent: POCH S.A. Gliwice

- Octan sodu trójwodny cz.d.a (Sodium acetale trihydrate)
  M = 136.08 g/mol
  numer serii: 70850
  Sigma – Aldrich

- Alkohol metylowy (czystość do HPLC)
  HPLC Isocratic Grade
  M = 41,05 g/mol
  numer serii: 0708822008
  producent: J. T. BAKER

- Kwas octowy (99-100 %) (czystość do HPLC)
  numer serii: 0705205009
  producent: J. T. BAKER

- Acetonitryl (czystość do HPLC)
  HPLC Gradient Grade
  numer serii: 0722808003
  producent: J. T. BAKER

- Uracyl p.p.a.
  numer serii: 2006219
  producent: Fluka

- Cefuroksym sodowy CRS (wzorzec wg Ph Eur)
  producent: LGC Promochem (UK)

3. Aparatura i sprzęt.

- Zestaw HPLC Shimadzu, Kioto – Japan, składający się z następujących modułów:
  - Pompa dwutłokowa: LC-20AD do gradientu wysoko i niskociśnieniowego
  - Degazer: 5 kanałowy DGU-20A5
  - Automatyczny podajnik próbek z chłodzeniem: SIL-20AC
  - Detektor diodowy: SPD-M20A
  - Piec do kolumn z chłodzeniem: CTO-20AC
  - Komputer HP i oprogramowanie LC Solution

- Kolumna chromatograficzna:
  GraceSmart C-18 (5 μm, 150 mm x 4,6 mm)
  LOT No: 39/115/5
  Hardwarde type: Female (B)
  PN 5138812
  producent: Alltech (Belgia)

- Prekolumna chromatograficzna:
  Alltima™HP C-18 (5 μm, 7,5 x 4,6 mm)
  producent: Alltech (Belgia)

- Loża do pracy aseptycznej
  Typ KL-21
  producent: POLON Poznań S.A.

- Spektrofotometr Jasco V – 530
  pracujący w z zakresie UV-Vis
  producent: Jasco Corporation Japan

- Aparat destylacyjny DE 8/70
  producent: Telmed® Warszawa

- Lodówki farmaceutyczne
  Typ MED.-28
  producent: Kirsch (Niemcy)

- Sterylizator parowy (autoklaw)
  Typ AS 446, wersja WPA
  producent: Spółdzielnia mechaników SMS Warszawa

- Sterylizator na suche gorące powietrze SP-65
  producent: WAMED Warszawa

- Suszarka laboratoryjna SUP 100M
  producent: WAMEWD Warszawa

- Osmometr Krioskop 800 cl (OSK 497)
  producent: TRIDENT MED s.c. Warszawa

- pH-metr CP-502
  producent: ELMERTOR Sp.j. Zabrze-Grzybowice

- pH-metr; Model IQ 150
  producent: IQ Scientific Instruments

- Waga analityczna Sartorius
  LE 225 D, max 220 g, d=0,01 mg
  producent: Sartorius (Niemcy)

- Waga elektroniczna
  WPS 100/C/2, max 110 g, min 20 mg, d = 1 mg
  producent: RadWAG Radom

- Waga elektroniczna
  WPS 720/C/2,max 720g, min 40 mg, d = 2 mg
  producent: RadWAG Radom

- Waga elektroniczna
  WPT 3C, max 3kg, d = 0.1 g
  producent: RadWAG Radom

- System oczyszczania wody Synergy
  producent: Millipore SAS (Francja)

- Wiskozymetr Höpplera KF10
  producent: Rheo Tec MeBtechnik GmbH (Niemcy)

- Zestaw do sączenia mikrobiologicznego Sartorius
  Typ 16692, P max 2,5 Bar
  producent: Sartorius A.G. (Niemcy)

- Gęstościomierz Densito 30 PX
  producent: Mettler Toledo GmbH (Szwajcaria)

- Mieszadło mechaniczne
  producent: IKA – WERKE GmbH & Co KG (Niemcy)

- Pipeta półautomatyczna (Mikropipeta), LM 1000/100-1000 µL
  Dokładność: ± 0,6 % LabMate
  producent: PZ HTL S.A. Warszawa

- Pipeta półautomatyczna (Mikropipeta),LM 100/10-100 µL
  Dokładność: ± 0,8 % LabMate
  producent: PZ HTL S.A. Warszawa

- Sączki do fazy ruchomej Millipore 0,45 µm
  producent: Millipore Copr. (USA)

- Sączki strzykawkowe Chromafil Pet-45/15
  producent: Macherey-Nagel

- Laboratoryjny sprzęt szklany:
  - kolby miarowe 25 mL, dokładność ± 0,08 mL
  - kolby miarowe 100 mL, dokładność ± 0,10 mL
  - pipeta wielomiarowa 10 mL, dokładność ± 0,1 mL

  producent: Simax (Czechy)

4. Skład, sposób wykonania i właściwości fizykochemiczne roztworów substancji pomocniczych przeznaczonych do kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych.

4.1. Bufory cytrynianowe.

Tabela 1. Skład buforów cytrynianowych.

Skład	Numer buforu cytrynianowego		
	I	II	III
Sodu cytrynian dwuwodny	51,005 mM	102,01 mM	204,02 mM
Kwas cytrynowy jednowodny	3,57 mM	7,14 mM	14,28 mM
Woda oczyszczona	do 1000,0 g	do 1000,0 g	do 1000,0 g

Tok sporządzania:

W zlewce z połową przepisanej ilości wody rozpuszczono sodu cytrynian dwuwodny. W drugiej zlewce z pozostałą ilością wody rozpuszczono kwas cytrynowy jednowodny. Przygotowane roztwory następnie połączono i przesączono przez sączek ze szkła spiekanego typu Schott G-3. Po około godzinie zmierzono pH i ciśnienie osmotyczne sporządzonych buforów. Roztwory rozlano do butelek infuzyjnych o pojemności 250 mL, zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami, a następnie wyjałowiono w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 20 minut przy nadciśnieniu 101,1 kPa. Po wyjałowieniu ponownie przeprowadzono pomiary pH i ciśnienia osmotycznego. Wyniki oceny fizycznej przed jak i po wyjałowieniu przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Ocena fizyczna sporządzonych buforów cytrynianowych.

Numer buforu	Przed wyjałowieniem			Po wyjałowieniu		
	pH	ciśnienie osmotyczne (mOsm/L)	wygląd roztworu	pH	ciśnienie osmotyczne (mOsm/ l)	wygląd roztworu
I	6,32 ± 0,03	161 ± 3	bezbarwny klarowny	6,28± 0.01	159 ± 1	bezbarwny klarowny
II	6,24 ± 0.03	301 ± 0	bezbarwny klarowny	6,25±0,03	303 ± 3	bezbarwny klarowny
III	6,01 ±0,00	576 ± 2	bezbarwny klarowny	6,05± 0,02	581 ± 5	bezbarwny klarowny

4.2. Roztwór alkoholu poliwinylowego.

Tabela 3. Skład roztworu alkoholu poliwinylowego (PVA).

Skład (g)	
Alkohol poliwinylowy	6,0
Woda oczyszczona	94,0

Tok sporządzania:

Do wytarowanej zlewki odważono przepisaną ilość wody o temperaturze pokojowej. Następnie uruchomiono mieszadło mechaniczne (około 300 obr/min) i wsypywano powoli odważony wcześniej alkohol poliwinylowy (PVA). Po wsypaniu całej ilości substancji, zlewkę ogrzewano na łaźni wodnej w temperaturze 90 °C przez 90 minut, mieszając jej zawartość. Po upływie tego czasu zlewkę zdjęto z łaźni i roztwór ochłodzono do temperatury 20 °C. Wyparowaną wodę uzupełniono do wymaganej masy i roztwór przesączono przez sączek typu Shott G-1. Roztwór alkoholu poliwinylowego przelano do butelek infuzyjnych o pojemności 250 mL. Butelki zamknięto korkami gumowymi i metalowymi kapslami, a następnie wyjałowiono w autoklawie w temperaturze 121 C, przy nadciśnieniu 101,1 kPa przez 20 min. Przed

jak i po wyjałowieniu roztworu alkoholu poliwinylowego, przeprowadzono pomiary: pH, ciśnienia osmotycznego oraz lepkości, których wyniki przytoczono w tabeli 4.

Tabela 4. Ocena fizyczna roztworu alkoholu poliwinylowego (PVA) przeznaczonego do wykonania kropli recepturowych.

Roztwór alkoholu poliwinylowego (PVA)							
Przed wyjałowieniem				**Po wyjałowieniu**			
pH	**ciśnienie osmotyczne (mOsm/L)**	**lepkość (mPa·s)**	**wygląd roztworu**	**pH**	**ciśnienie osmotyczne (mOsm/L)**	**lepkość (mPa·s)**	**wygląd roztworu**
5,53 ± 0,03	28 ± 2	44,23 ± 0,06	bezbarwny klarowny	4,48 ± 0,03	26 ± 1	42,31 ± 0,08	bezbarwny klarowny

4.3. Roztwory środków konserwujących.

4.3.1. Roztwór boranu fenylortęciowego.

Tabela 5. Skład 0,04 % (w/w) roztworu boranu fenylortęciowego.

Skład (g)	
Boran fenylortęciowy	0,04
Woda oczyszczona	99,96

Tok sporządzenia:

Odważono 0,04 g boranu fenylortęciowego z dokładnością do 0,001 g. Substancję rozpuszczono w wodze destylowanej, którą wcześniej podgrzano do temperatury 95 °C. Roztwór przesączono przez sączek ze szkła spiekanego Shott G-3, a następnie przelano do butelki infuzyjnej o pojemności 100 mL, zamknięto gumowym korkiem oraz metalowym kapslem i wyjałowiono w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 20 minut, przy nadciśnieniu 101,1 kPa. W warunkach aseptycznych roztwór rozlano do butelek z ciemnego szkła o pojemności 10 mL i zakręcono nakrętkami z zakraplaczami.

4.3.2. Alkohol β-fenyloetylowy.

Tok sporządzania:

W warunkach aseptycznych alkohol β-fenyloetylowy przelano do jałowej butelki z ciemnego szkła, następnie zamknięto jałowym zakraplaczem i oznaczono sygnaturą.

5. Badanie zgodności farmaceutycznej 5 % (w/w) roztworów wodnych cefuroksymu sodowego z substancjami pomocniczymi włączonymi do składu kropli.

Analogicznie jak w wcześniejszych badaniach nad technologią sporządzania 1 % recepturowych kropli do oczu z cefuroksymem, prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Technologii Postaci Leku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu [68,72], przeprowadzono test zgodności farmaceutycznej 5 % wodnych roztworów cefuroksymu sodowego z substancjami pomocniczymi, które w założeniu pracy miały być włączone do składu zaproponowanych kropli do oczu w wersjach recepturowych i w wersjach „przemysłowych". Wyniki badań przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Badanie zgodności farmaceutycznej cefuroksymu sodowego w 5 % roztworach wodnych z substancjami pomocniczymi włączonymi do składu kropli.

5 % roztwór wodny cefuroksymu sodowego		**Barwa, klarowność**			**Interakcja**
Substancja pomocnicza	**Stężenie (%)**	**Po sporządzeniu**	**W czasie przechowywania przez 14 dni**		
			w temp. 20 °C	**w temp. 4°C**	
Bufor cytrynianowy I Skład buforu: cytrynian sodu •$2H_2O$ kwas cytrynowy •H_2O	 1,5 0,075	słomkowa klarowny	jasnożółta klarowny	cytrynowa klarowny	-
Bufor cytrynianowy II Skład buforu: cytrynian sodu •$2H_2O$ kwas cytrynowy•H_2O	 3,0 0,15	słomkowa klarowny	jasnożółta klarowny	cytrynowa klarowny	-
Roztwór PVA	~ 3 %	słomkowa klarowny	jasnożółta klarowny	cytrynowa klarowny	-
Boran fenylortęciowy	0,001	słomkowa klarowny	jasnożółta klarowny	cytrynowa klarowny	-
Alkohol β-fenyloetylowy	0,400	słomkowa klarowny	jasnożółta klarowny	cytrynowa klarowny	-

6. Skład, sposób wykonania, właściwości fizykochemiczne oraz ocena skuteczności przeciwdrobnoustrojowej rozpuszczalników przeznaczonych do wersji „przemysłowych” 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym.

6.1. Skład rozpuszczalników przeznaczonych do wersji „przemysłowych” 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym.

Na podstawie wyników trwałości chemicznej cefuroksymu sodowego w wersjach recepturowych kropli do oczu, badanej metodą HPLC, ustalono skład rozpuszczalników przeznaczonych do „przemysłowych” dwuzbiornikowych wersji 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym. Skład rozpuszczalników przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Skład rozpuszczalników przeznaczonych do wersji „przemysłowych” 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym.

Skład rozpuszczalników do „przemysłowych” wersji kropli z cefuroksymem sodowym na 100,0 g	**Numer rozpuszczalnika**							
	Rozpuszczalniki przeznaczone do 1 % kropli				**Rozpuszczalniki przeznaczone do 5 % kropli**			
	1	**2**	**3**	**4**	**I**	**II**	**III**	**IV**
kwas cytrynowy • H_2O	3,0	2,912	3,0	2,912	1,5	1,454	1,5	1,454
cytrynian sodu • $2H_2O$	0,15	0,146	0,15	0,146	0,075	0,073	0,075	0,073
roztwór alkoholu poliwinylowego (PVA) η = 44,21 mPa·s	-	-	50,0	48,535	-	-	50,0	48,474
0,04 % roztwór boranu fenylortęciowego	-	2,525	-	2,525	-	2,632	-	2,632
alkohol β-fenyloetylowy	-	0,404	-	0,404	-	0,421	-	0,421
woda oczyszczona	do 100,0	do 100,0	do 100,0	do 100,0	do 100,0	do 100,0	do 100,0	do 100,0

6.2. Sposób wykonania rozpuszczalników przeznaczonych do wersji „przemysłowych" kropli.

W pierwszym etapie sporządzono roztwory substancji pomocniczych: bufory cytrynianowe, roztwór alkoholu poliwinylowego i roztwory konserwantów według procedury przedstawionej w punktach: 4.1., 4.2. i 4.3.

- **Rozpuszczalnik „przemysłowy" nr 1 oraz nr I.**

Sporządzony bufor cytrynianowy przesączono przez sączek ze szkła spiekanego Shott G-3. Następnie przelano do butelek infuzyjnych o pojemności 100 mL, zamknięto gumowy korkiem i metalowym kapslem. Rozpuszczalnik wyjałowiano w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 20 minut, przy nadciśnieniu 101,1 kPa .

- **Rozpuszczalnik „przemysłowy" nr 2 oraz nr II.**

Sporządzony bufor cytrynianowy zakonserwowano roztworem pomocniczym boranu fenylortęciowego i alkoholem β-fenyloetylowym. Następnie przesączono przez sączek ze szkła spiekanego Shott G-3 i przelano do butelek infuzyjnych o pojemności 100 mL, zamknięto gumowym korkiem i metalowym kapslem. Rozpuszczalnik wyjałowiano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 minut, przy nadciśnieniu 101,1 kPa.

- **Rozpuszczalnik „przemysłowy" nr 3 oraz nr III.**

Do roztworu wodnego alkoholu poliwinylowego dodawano stopniowo, cały czas mieszając, roztwór buforu cytrynianowego. Sporządzony rozpuszczalnik przesączono przez sączek ze szkła spiekanego Shott G-1 i przelano do butelek infuzyjnych o pojemności 100 mL, zamknięto gumowym korkiem i metalowym kapslem. Rozpuszczalnik wyjaławiano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 minut, przy nadciśnieniu 101,1 kPa.

- **Rozpuszczalnik „przemysłowy” nr 4 oraz nr IV.**

Do roztworu wodnego alkoholu poliwinylowego dodawano stopniowo, cały czas mieszając, zakonserwowany roztwór buforu cytrynianowego. Sporządzony rozpuszczalnik przesączono przez sączek ze szkła spiekanego Shott G-1 i przelano do butelek infuzyjnych o pojemności 100 mL, zamknięto gumowym korkiem i metalowym kapslem. Rozpuszczalnik wyjaławiano w autoklawie w temperaturze 121 °C przez 20 minut, przy nadciśnieniu 101,1 kPa.

6.3. Ocena fizyczna rozpuszczalników przeznaczonych do kropli „przemysłowych” w trakcie przechowywania.

Sporządzone i wyjałowione rozpuszczalniki poddano ocenie jakościowej, a następnie umieszczono w komorach klimatycznych Farmaceutycznej Spółdzielni Pracy „Filofarm” w Bydgoszczy, w celu przeprowadzenia testu stabilności zgodnie z wytycznymi ICH Q1A(R2) [74]. Rozpuszczalniki przechowywano przez okres 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 °C ± 2 ºC, przy wilgotności 75 % RH ± 5% RH oraz przez okres 12-stu miesięcy w temperaturze 25 °C ± 2 ºC, przy wilgotności 60 % RH ± 5% RH. W odstępach trzymiesięcznych prowadzono ocenę fizyczną rozpuszczalników pod kątem zmian: pH, ciśnienia osmotycznego, lepkości w przypadku wersji zawierających w swoim składzie alkohol poliwinylowy i wyglądu. Wyniki badań świeżo wykonanych rozpuszczalników oraz w trakcie ich przechowywania przedstawiono w tabeli 8, tabeli 9 oraz tabeli 10.

Tabela 8. Ocena fizyczna rozpuszczalników przeznaczonych do 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych” po 3 i 6 miesiącach przechowywania w temperaturze 25 °C ± 2 ºC, przy wilgotności 60 % RH ± 5% RH.

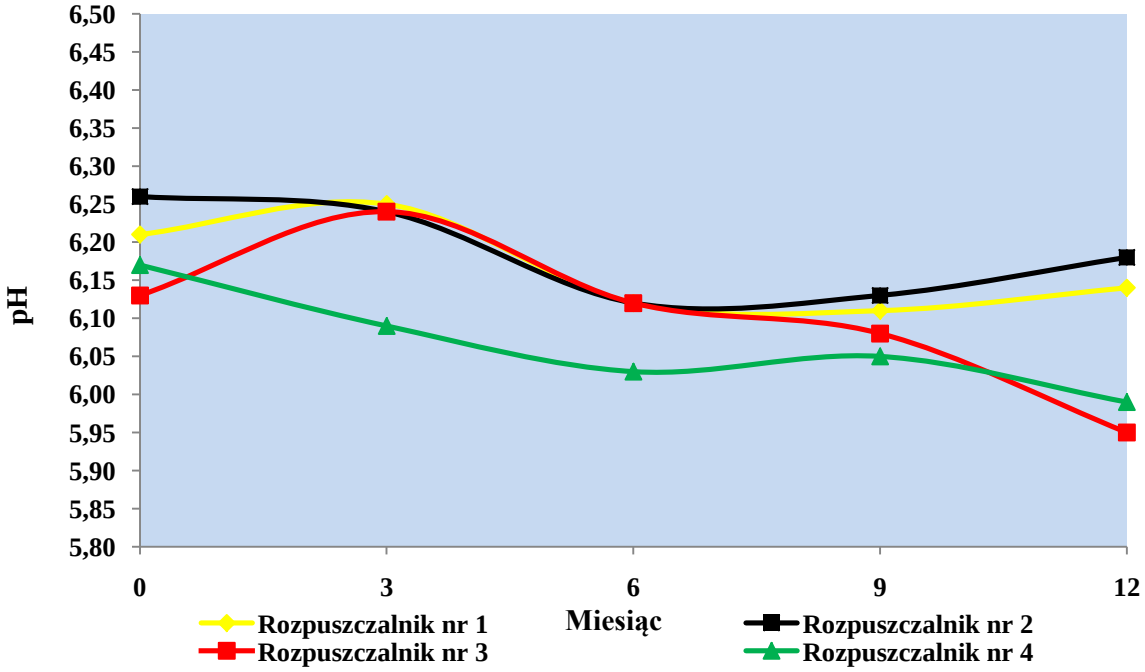
Numer rozpuszczalnika	Rozpuszczalnik świeżo sporządzony po wyjałowieniu				Rozpuszczalnik po 3 miesiącach przechowywania w temperaturze 25 °C 60 % RH ± 5 %				Rozpuszczalnik po 6 miesiącach przechowywania w temperaturze 25 °C 60 % RH ± 5 %			
	pH	Ciśnienie osmotyczne (mOsm/L)	Gęstość (g/mL)	Lepkość (mPa·s)	pH	Ciśnienie osmotyczne (mOsm/ L)	Gęstość (g/mL)	Lepkość (mPa·s)	pH	Ciśnienie osmotyczne (mOsm/L)	Gęstość (g/mL)	Lepkość (mPa·s)
1	6,21 ± 0,01	300 ± 4	-	-	6,25 ± 0,01	306 ± 1	-	-	6,12 ± 0,02	303 ± 2	-	-
2	6,26 ± 0,02	337 ± 4	-	-	6,24 ± 0,02	339 ± 2	-	-	6,12 ± 0,02	334 ± 1	-	-
3	6,13 ± 0,01	343 ± 4	1,0232 ± 0,0001	7,88 ± 0,00	6,24 ± 0,02	339 ± 2	1,0248 ± 0,0001	8,32 ± 0,01	6,12 ± 0,02	334 ± 1	1,0253 ± 0,0001	8,69 ± 0,01
4	6,17 ± 0,00	367 ± 2	1,0223 ± 0,0000	7,47 ± 0,00	6,09 ± 0,01	380 ± 4	1,0240± 0,0002	8,15 ± 0,00	6,03 ± 0,01	379 ± 2	1,0247 ± 0,0001	8,52 ± 0,01
I	6,38 ± 0,00	159 ± 1	-	-	6,34 ± 0,02	163 ± 0		-	6,26 ± 0,01	162 ± 1		
II	6,40 ± 0,02	195 ± 2	-	-	6,32 ± 0,02	198 ± 2		-	6,29 ± 0,02	194 ± 2		
III	6,08 ± 0,01	192 ± 4	1,0185 ± 0,0001	8,24 ± 0,00	6,02 ± 0,01	197 ± 1	1,0150 ± 0,0001	8,34 ± 0,00	5,96 ± 0,02	200 ± 2	1,0152 ± 0,0002	8,43 ± 0,01
IV	6,12 ± 0,01	224 ± 3	1,0145 ± 0,0001	8,03 ± 0,00	6,03 ± 0,01	233 ± 3	1,0151 ± 0,0000	8,51 ± 0,01	6,00 ± 0,03	232± 2	1,0153 ± 0,0001	8,51 ± 0,01
Wygląd: wszystkie wersje rozpuszczalników po okresie 3 i 6 miesięcy przechowywania pozostały bezbarwne i klarowne												

Tabela 9. Ocena fizyczna rozpuszczalników przeznaczonych do 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych” po 9 i 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 25 ºC ± 2 ºC, przy wilgotności 60 % RH ± 5% RH.

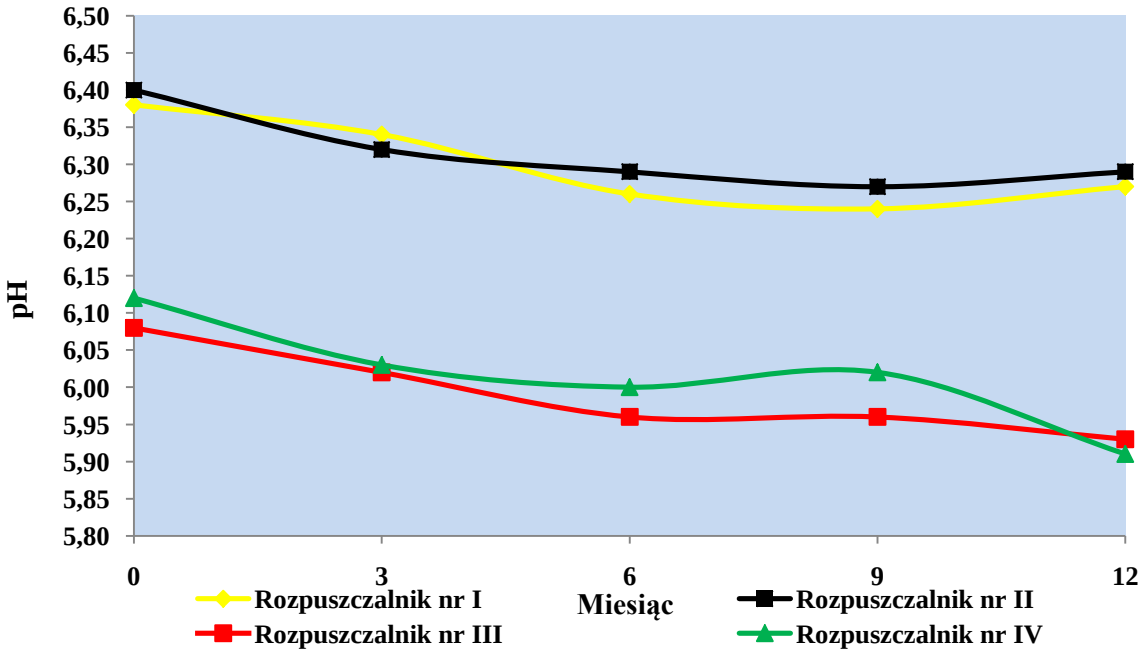
Numer rozpuszczalnika	Rozpuszczalnik świeżo sporządzony po wyjałowieniu				Rozpuszczalnik po 9 miesiącach przechowywania w temperaturze 25 ºC 60 % RH ± 5 %				Rozpuszczalnik po 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 25 ºC 60 % RH ± 5 %			
	pH	Ciśnienie osmotyczne (mOsm/L)	Gęstość (g/mL)	Lepkość (mPa·s)	pH	Ciśnienie osmotyczne (mOsm/ L)	Gęstość (g/mL)	Lepkość (mPa·s)	pH	Ciśnienie osmotyczne (mOsm/L)	Gęstość (g/mL)	Lepkość (mPa·s)
1	6,21 ± 0,01	300 ± 4	-	-	6,11 ± 0,01	306 ± 1	-	-	6,14 ± 0,02	311 ± 2	-	-
2	6,26 ± 0,02	337 ± 4	-	-	6,13 ± 0,01	335 ± 2	-	-	6,18 ± 0,02	339 ± 1	-	-
3	6,13 ± 0,01	343 ± 4	1,0232 ± 0,0001	7,88 ± 0,00	6,08 ± 0,00	342 ± 2	1,0242 ± 0,0001	8,72 ± 0,00	5,95 ± 0,01	353 ± 1	1,0235 ± 0,0000	8,79 ± 0,02
4	6,17 ± 0,00	367 ± 2	1,0223 ± 0,0000	7,47 ± 0,00	6,05 ± 0,01	378 ± 2	1,0239± 0,0000	8,50 ± 0,01	5,99 ± 0,01	380 ± 1	1,0227± 0,0001	8,53 ± 0,01
I	6,38 ± 0,00	159 ± 1	-	-	6,24 ± 0,00	162 ± 0		-	6,27 ± 0,01	161 ± 2		
II	6,40 ± 0,02	195 ± 2	-	-	6,27 ± 0,01	193 ± 0		-	6,29 ± 0,01	193 ± 2		
III	6,08 ± 0,01	192 ± 4	1,0185 ± 0,0001	8,24 ± 0,00	5,96 ± 0,01	196 ± 2	1,0151 ± 0,0001	8,41 ± 0,01	5,93 ± 0,01	197 ± 2	1,0137 ± 0,0001	8,48 ± 0,01
IV	6,12 ± 0,01	224 ± 3	1,0145 ± 0,0001	8,03 ± 0,00	6,02 ± 0,02	232± 1	1,0150 ± 0,0002	8,50± 0,02	5,91 ± 0,02	230 ± 2	1,0133 ± 0,0000	8,20± 0,02
Wygląd: wszystkie wersje rozpuszczalników po okresie 9 i 12 miesięcy przechowywania pozostały bezbarwne i klarowne												

Tabela 10 . Ocena fizyczna rozpuszczalników przeznaczonych do 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych” po 3 i 6 miesiącach przechowywania w temperaturze 40 °C ± 2 ºC, przy wilgotności 75 % RH ± 5% RH.

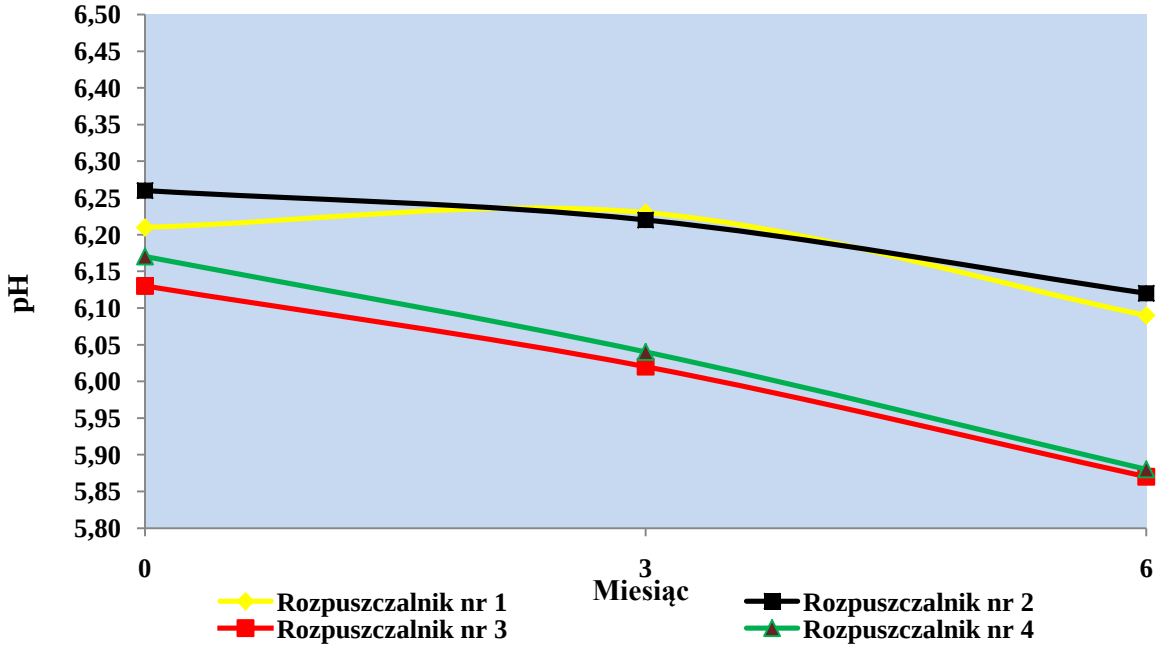
Numer rozpuszczalnika	Rozpuszczalnik świeżo sporządzony po wyjałowieniu				Rozpuszczalnik po 3 miesiącach przechowywania w temperaturze 40 ºC 75 % RH ± 5 %				Rozpuszczalnik po 6 miesiącach przechowywania w temperaturze 40 ºC 75 % RH ± 5 %			
	pH	Ciśnienie osmotyczne (mOsm/L)	Gęstość (g/mL)	Lepkość (mPa·s)	pH	Ciśnienie osmotyczne (mOsm/ L)	Gęstość (g/mL)	Lepkość (mPa·s)	pH	Ciśnienie osmotyczne (mOsm/L)	Gęstość (g/mL)	Lepkość (mPa·s)
1	6,21 ± 0,01	300 ± 4	-	-	6,23 ± 0,02	307 ± 0	-	-	6,09 ± 0,00	306 ± 2	-	-
2	6,26 ± 0,02	337 ± 4	-	-	6,22 ± 0,02	339 ± 2	-	-	6,12 ± 0,00	337 ± 2	-	-
3	6,13 ± 0,01	343 ± 4	1,0232 ± 0,0001	7,88 ± 0,00	6,02± 0,01	356 ± 4	1,0247 ± 0,0002	8,15 ± 0,00	5,87 ± 0,02	363± 2	1,0238 ± 0,0001	8,68 ± 0,01
4	6,17 ± 0,00	367 ± 2	1,0223 ± 0,0000	7,47 ± 0,00	6,04± 0,01	386 ± 2	1,0241 ± 0,0001	8,40 ± 0,02	5,88 ± 0,02	388± 1	1,0232 ± 0,0001	8,46 ± 0,01
I	6,38 ± 0,00	159 ± 1	-	-	6,30± 0,01	163 ± 1		-	6,28 ± 0,00	162± 0		
II	6,40 ± 0,02	195 ± 2	-	-	6,33 ± 0,02	198 ± 1		-	6,29 ± 0,01	199 ± 1		
III	6,08 ± 0,01	192 ± 4	1,0185 ± 0,0001	8,24 ± 0,00	5,94 ± 0,01	195 ± 4	1,0151 ± 0,0000	8,40 ± 0,01	5,79± 0,01	215 ± 4	1,0140 ± 0,0000	8,39 ± 0,01
IV	6,12 ± 0,01	224 ± 3	1,0145 ± 0,0001	8,03 ± 0,00	6,01 ± 0,01	234± 2	1,0151 ± 0,0000	8,51 ± 0,00	5,75± 0,01	249 ± 2	1,0143 ± 0,0001	8,50± 0,00
Wygląd: wszystkie wersje rozpuszczalników po okresie 9 i 12 miesięcy przechowywania pozostały bezbarwne i klarowne												



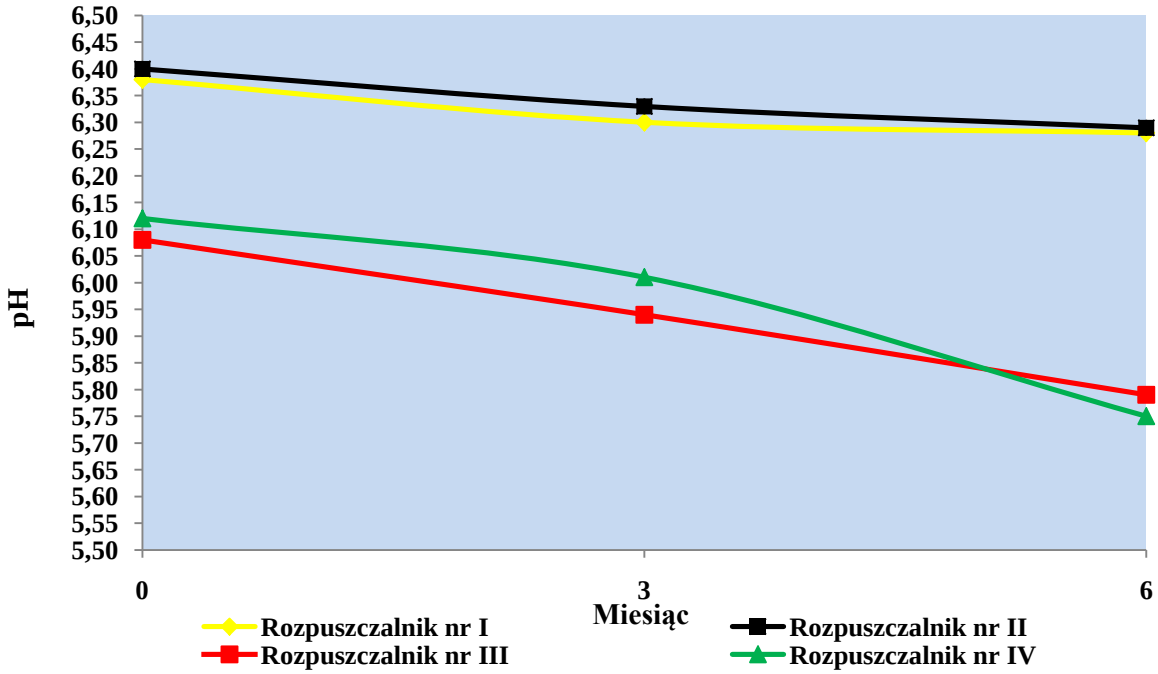
Rycina 3. Zmiany pH w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 1 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 12-stu miesięcy w temperaturze 25 °C ± 2 °C/60 RH ± 5 RH.



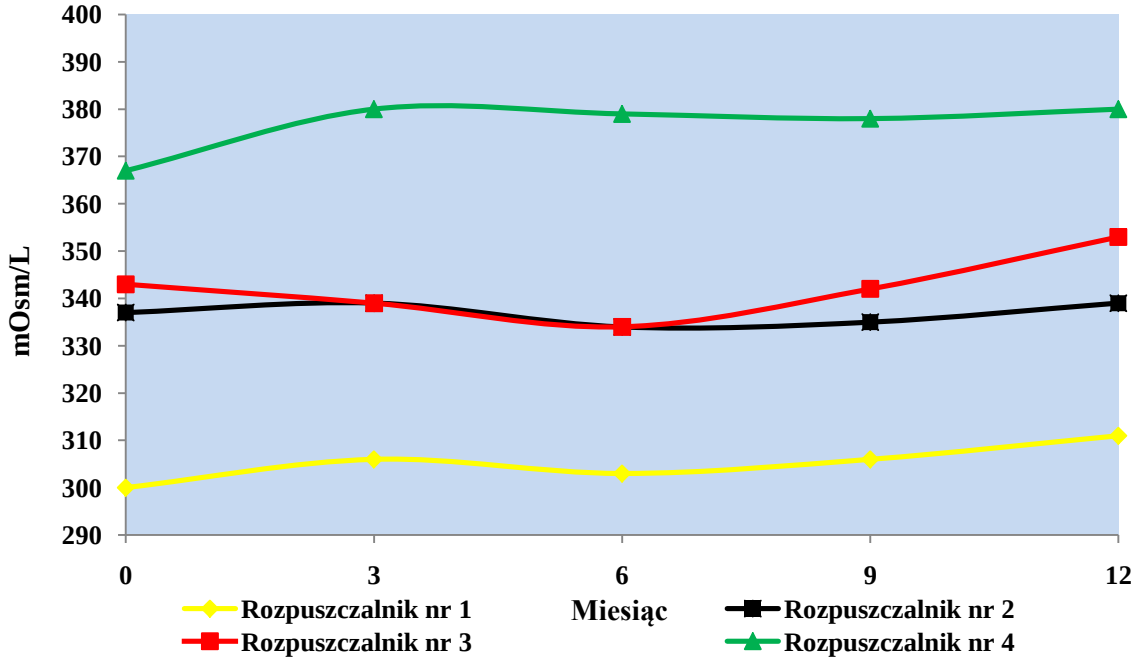
Rycina 4. Zmiany pH w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 12-stu miesięcy w temperaturze 25 °C ± 2 °C/60 RH ± 5 RH.



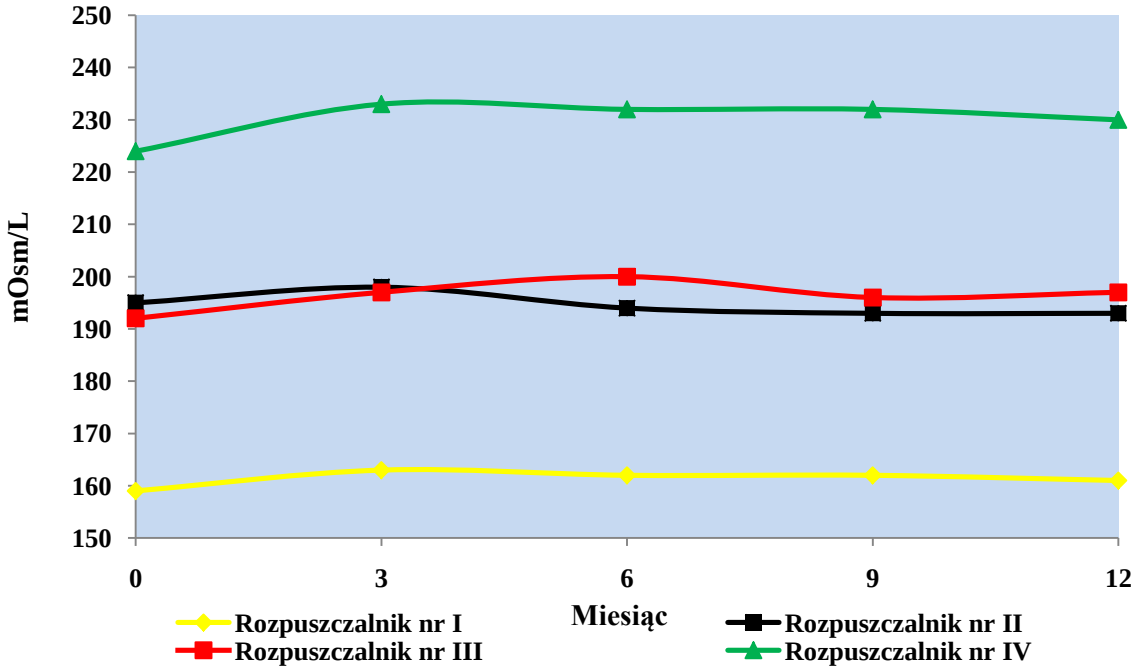
Rycina 5. Zmiany pH w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 1 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 ºC ± 2 ºC/75 RH ± 5RH.



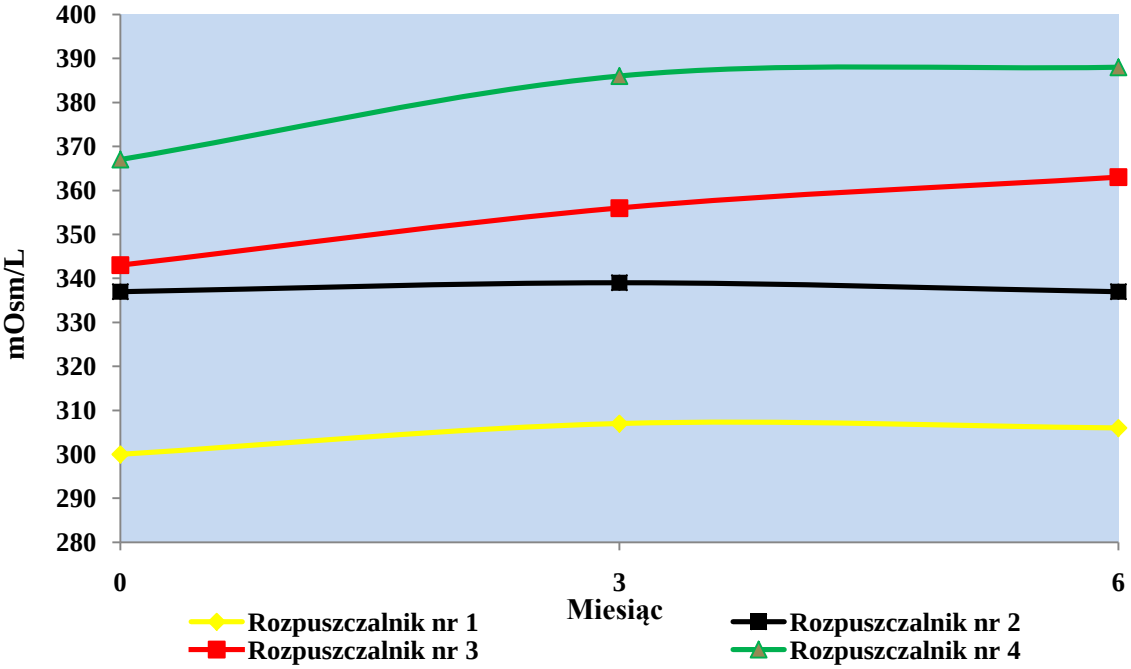
Rycina 6. Zmiany pH w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 ºC ± 2 ºC/75 RH ± 5RH.



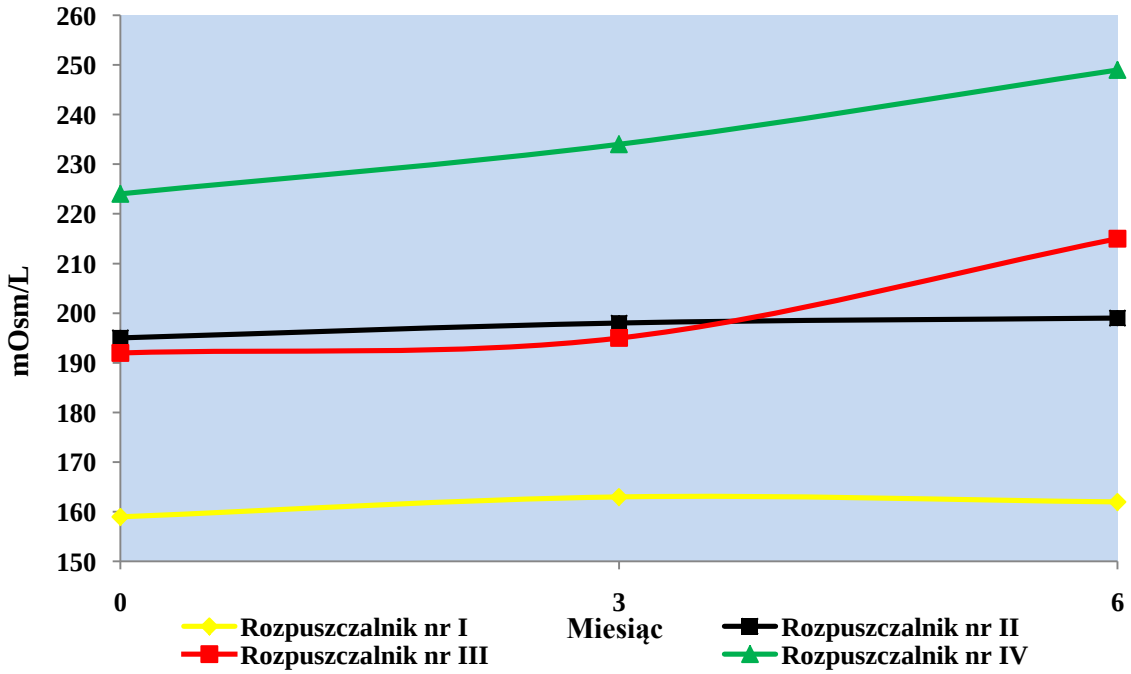
Rycina 7. Zmiany ciśnienia osmotycznego w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 1 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 12-stu miesięcy w temperaturze 25 ºC ± 2 ºC/60 RH ± 5 RH.



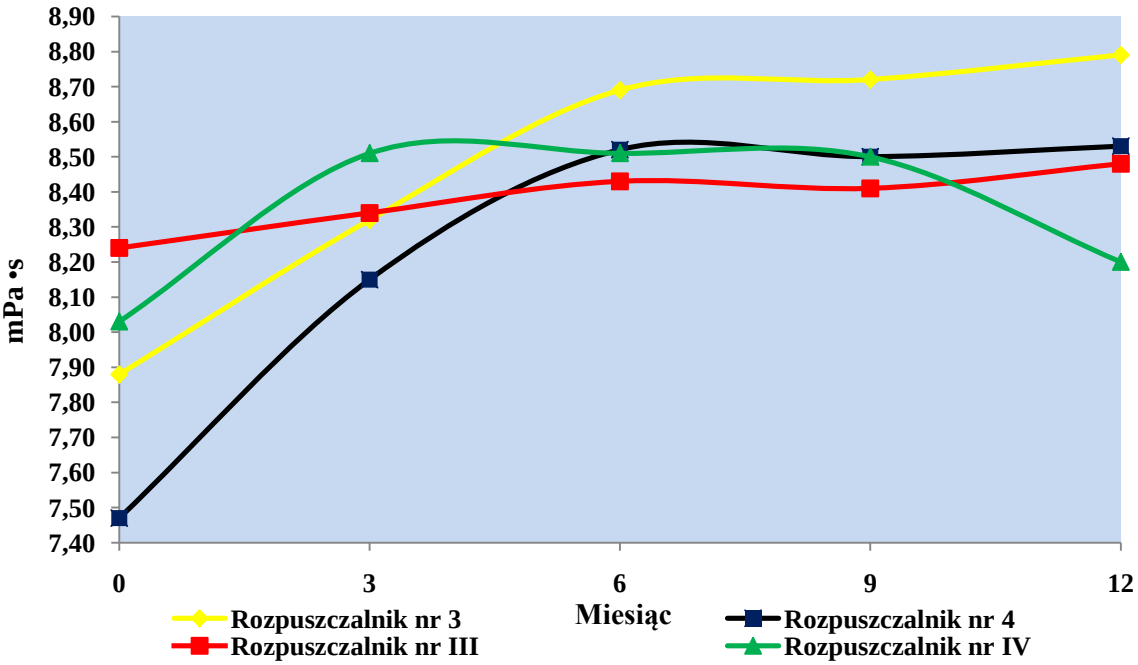
Rycina 8. Zmiany ciśnienia osmotycznego w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 12-stu miesięcy w temperaturze 25 ºC ± 2 ºC/60 RH ± 5 RH.



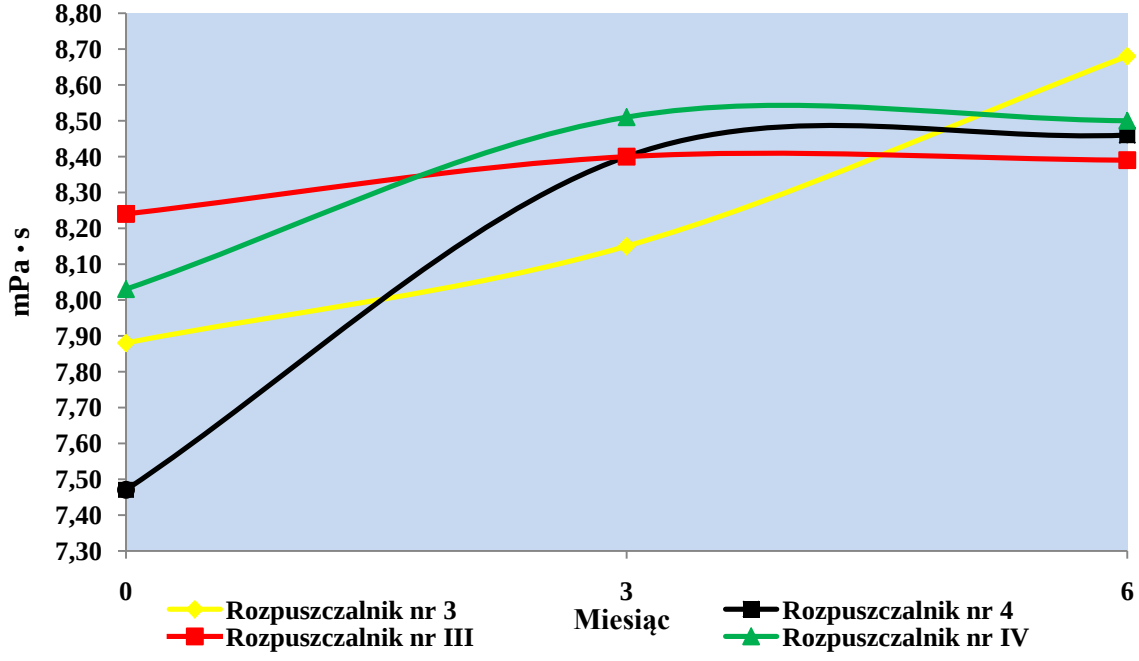
Rycina 9. Zmiany ciśnienia osmotycznego w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 1 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 °C ± 2 °C/75 RH ± 5RH.



Rycina 10. Zmiany ciśnienia osmotycznego w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 °C ± 2 °C/75 RH ± 5RH.



Rycina 11. Zmiany lepkości w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 12-stu miesięcy w temperaturze 25 °C ± 2 °C/60 RH ± 5 RH.



Rycina 12. Zmiany lepkości w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 °C ± 2 °C/75 RH ± 5 RH.

6.4. Badanie skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej rozpuszczalników przeznaczonych do wersji „przemysłowych" kropli, po 12 miesiącach przechowywania zgodnie z wytycznymi ICH.

W celu oceny skuteczności środków konserwujących w rozpuszczalnikach, po 12-stu miesiącach przechowywania w temperaturze 25 °C ± 2 ºC przy wilgotności 60 % RH ± 5% RH, przeprowadzono test konserwacji zgodnie wymogami Farmakopei Polskiej VII [75] i procedurą opisaną we wcześniejszych badaniach [72].

Badania skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej rozpuszczalników zostały wykonane w Katedrze i Zakładzie Bakteriologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkiewicza w Poznaniu, przez dr farm. Helenę Kukułę.

Materiał do badań mikrobiologicznych tj. rozpuszczalniki przemysłowe w wersjach nr 2 i nr 4 oraz wersjach nr II i nr IV zostały dostarczone przez Katedrę Technologii Postaci Leku Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, UMK w Toruniu.

W badaniach zastosowano szczepy drobnoustrojów testowych wymaganych przez Farmakopeę Polską VII: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404. Ponadto test konserwacji poszerzono o drobnoustroje nie ujęte w monografii 5.1.3. Farmakopei Polskiej VII : *Bacillus cereus* oraz *Listeria monocytogenes*.

W tabeli 11 przedstawiono kryterium akceptacji dla testu skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej wg Farmakopei Polskiej VII, wyrażone jako log redukcji liczby zdolnych do życia drobnoustrojów oraz jako stopień redukcji komórek w procentach, w stosunku do wartości uzyskanej dla inokulum. W tabeli 12 i 13 przedstawiono wyniki testu konserwacji dla rozpuszczalników przeznaczonych dla wersji „przemysłowych" 1 % i 5 % kropli do oczu.

Tabela 11. Wymogi testu konserwacji wg FP VII dla preparatów do oczu – kryterium A

	Sposób przedstawienia wyniku	**6 h**	**24 h**	**7 dni**	**28 dni**
Bakterie	**Log redukcji (FP VII)**	**2**	**3**	**-**	**BW [a]**
	Stopień redukcji komórek (%)	**99 %**	**99,90 %**	**-**	**100 %**
Grzyby	**Log redukcji (FP VII)**	**-**	**-**	**2**	**BN [b]**
	Stopień redukcji komórek (%)	**-**	**-**	**99 %**	

a - BW – brak wzrostu zdolnych do życia drobnoustrojów
b - BN – liczba drobnoustrojów nie zwiększa się

Tabela 12. Wyniki testu konserwacji dla rozpuszczalników nr 2 i nr 4, przeznaczonych do sporządzania 1 % kropli w wersjach „przemysłowych”, po 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 25 °C ± 2 ºC/60 % RH ± 5% RH.

Szczepy testowe	**Rozpuszczalnik nr 2**				**Rozpuszczalnik nr 4**			
	Stopień redukcji komórek (%)							
	6 h	**24 h**	**7 dni**	**28 dni**	**6 h**	**24 h**	**7 dni**	**28 dni**
Pseudomonas aeruginosa	99,99 %	100 %	-	100 %	99,99 %	100 %	-	100 %
Staphylococcus aureus	99,95 %	99,99 %	-	100 %	99,99 %	100 %	-	100 %
Candida albicans	-	-	100 %	100 %	-	-	99,99 %	100 %
Aspergillus niger	-	-	100 %	100%	-	-	99,99 %	100 %
Bacillus cereus	99,99 %	99,99 %	-	99,99 %	99,85 %	99,90 %	-	99,99 %
Listeria monocytogenes	99,97 %	100 %	-	100 %	99,99 %	99,99 %	-	100 %

Tabela 13. Wyniki testu konserwacji dla rozpuszczalników nr II i nr IV, przeznaczonych do sporządzania 5 % kropli w wersjach „przemysłowych”, po 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 25 °C ± 2 ºC/60 % RH ± 5% RH.

Szczepy testowe	**Rozpuszczalnik nr II**				**Rozpuszczalnik nr IV**			
	Stopień redukcji komórek (%)							
	6 h	**24 h**	**7 dni**	**28 dni**	**6 h**	**24 h**	**7 dni**	**28 dni**
Pseudomonas aeruginosa	99,99 %	100 %	-	100 %	99,99 %	100 %	-	100 %
Staphylococcus aureus	99,95 %	99,99 %	-	100 %	99,99 %	100 %	-	100 %
Candida albicans	-	-	100 %	100 %	-	-	99,99 %	100 %
Aspergillus niger	-	-	100 %	100 %	-	-	99,99 %	100 %
Bacillus cereus	99,99 %	99,99 %	-	99,99 %	99,89 %	99,90 %	-	99,99 %
Listeria monocytogenes	99,95 %	100 %	-	100 %	99,99 %	99,99 %	-	100 %

mieszanina konserwująca nie spełniała wymogów FP VII

7. Czynności przygotowawcze do pracy w warunkach aseptycznych.

Krople do oczu z cefuroksymem sodowym, jak i również roztwory wodne antybiotyku zostały wykonane w warunkach aseptycznych, w loży z laminarnym nawiewem jałowego powietrza. Roztwory substancji pomocniczych oraz użyty sprzęt wyjałowiono przed przystąpieniem do pracy.

7.1. Substancja lecznicza użyta do sporządzania kropli do oczu oraz roztworów wodnych antybiotyku.

W badaniach wykorzystano handlowy liofilizowany preparat cefuroksymu sodowego – Biofuroksym (fiolki a 1,5 g), w postaci substancji suchej przeznaczonej do iniekcji domięśniowych i dożylnych.

7.2. Jałowe roztwory substancji pomocniczych.

Bufory cytrynianowe, roztwór alkoholu poliwinylowego oraz roztwór boranu fenylortęciowego sporządzono, a następnie wyjałowiono w sterylizatorze parowym zgodnie z metodyką przytoczoną w punktach: 4.1, 4.2 i 4.3.

7.3. Przygotowanie sprzętu.

Przed przystąpieniem do procesu wyjaławiania, sprzęt szklany, sprzęt metalowy oraz sprzęt z tworzywa sztucznego dokładnie umyto w roztworze detergentu w ciepłej wodzie, następnie wypłukano bieżącą wodą do zaniku piany oraz trzykrotnie popłukano wodą destylowaną. W zależności od rodzaju sprzętu zastosowano chemiczne bądź fizyczne metody wyjaławiania. Szczegółowe procedury przedstawiono w tabeli 14.

Tabela 14. Procedury wyjaławiania sprzętu wykorzystanego do pracy w warunkach aseptycznych.

Rodzaj sprzętu	Metoda Wyjaławiania	Procedura
Sączki membranowe Sartorius 0,22 µm z oprawkami	Aparat : Sterylizator parowy Czynnik wyjaławiający: nasycona para wodna Czas wyjaławiania : 20 minut Temperatura: 121 ºC Nadciśnienie: 101 kPa	Wewnątrz umytych oprawek umieszczono sączki membranowe Sartorius 0,22 µm i zawinięto w pergamin. Złożone zestawy do sączenia wyjaławiającego przeniesiono w puszce sterylizacyjnej do autoklawu.
Korki gumowe do butelek infuzyjnych i nakrętki do słoików		Umyte korki i nakrętki do słoików zanurzono w wodzie destylowanej i umieszczono w sterylizatorze parowym.
Sprzęt szklany: zlewki, butelki, słoiki, bagietki	Aparat : Sterylizator powietrzny Czynnik wyjaławiający: suche gorące powietrze Czas wyjaławiania : 30 minut Temperatura: 180 ^{0}C	Po umyciu, sprzęt zawinięto w folię aluminiową i po umieszczeniu w puszce sterylizacyjnej przeniesiono do sterylizatora powietrznego.
Sprzęt metalowy: szpatułki dentystyczne, pęsety, kapsle aluminiowe do butelek infuzyjnych		
Zakraplacze	Czynnik wyjaławiający: 5% wodny roztwór chlorku benzalkoniowego Czas wyjaławiania: 24 h	Umyte zakraplacze zanurzono w słoiku w 5% wodnym roztworze chlorku benzalkoniowego. Słoik z zakraplaczami umieszczono w sterylizatorze powietrznym na 1 godzinę i wyjaławiano w temp. 70 ºC. Następnie słoik szczelnie zamknięto nakrętką i pozostawiono jeszcze przez okres 24 godzin w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, w warunkach aseptycznych (w loży) wypłukano zakraplacze w wodzie jałowej i umieszczono w jałowych słoikach. Słoiki umieszczono w sterylizatorze powietrznym w temp. 70 ºC, a po wysuszeniu zakraplaczy słoiki szczelnie zamknięto.

7.4 Przygotowanie loży do pracy w warunkach aseptycznych.

Powierzchnie loży umyto ciepłym roztworem detergentu i przetarto 1% roztworem chlorku benzalkoniowego. W loży umieszczono wyjałowiony sprzęt i roztwory substancji pomocniczych oraz fiolki z antybiotykiem. Na 30 minut przed rozpoczęciem wykonywania kropli, włączono laminarny nawiew jałowego powietrza oraz lampy UV. W momencie przystąpienia do pracy wyłączono lampy UV.

8. Aseptyczne sporządzanie 1 % i 5 % (w/w) kropli do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych oraz roztworów wodnych antybiotyku.

8.1. Skład recepturowy kropli i roztworów wodnych antybiotyku.

W tabeli 15 przedstawiono skład wykonanych 1% i 5 % (w/w) roztworów wodnych cefuroksymu sodowego oraz kropli do oczu w wersjach recepturowych.

Tabela 15. Skład 1 % i 5 % (w/w) kropli recepturowych z cefuroksymem sodowym oraz roztworów wodnych antybiotyku.

Składniki na 100g kropli	**1 % w/w**					**5 % w/w**				
	Symbol wersji									
	$0_{(1\%)}$	**1R**	**2R**	**3R**	**4R**	**$0_{(5\%)}$**	**IR**	**IIR**	**IIIR**	**IVR**
Biofuroksym (Cefuroksym sodowy)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Roztwór PVA (η = 42,31 mPa • s)	-	-	-	49,5	48,05	-	-	-	47,5	46,5
0,04 % roztwór boranu fenylortęciowego	-	-	2,5	-	2,5	-	-	2,5	-	2,5
Alkohol ß-fenyloetylowy	-	-	0,4	-	0,4	-	-	0,4	-	0,4
Woda do injekcji	99,0	-	-	-	-	95,0	-	-	-	-
Bufor cytrynianowy I	-	-	-	-	-	-	95,0	92,1	-	-
Bufor cytrynianowy II	-	99,0	96,1	-	-	-	-	-	47,5	46,5
Bufor cytrynianowy III	-	-		49,5	48,05	-	-	-	-	-

8.2. Uzasadnienie zaprogramowanego składu kropli.

Tabela 16**.** Uzasadnienie zaprogramowanego składu recepturowych kropli.

Symbol wersji recepturowej:	**Cel wykonania poszczególnych wersji recepturowych**
$0_{(1\%)}$ i $0_{(5\%)}$	Zbadanie właściwości fizykochemicznych i trwałości antybiotyku określonej metodą HPLC w 1 % i 5 % roztworach wodnych cefuroksymu sodowego, przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni. W oparciu o otrzymane wyniki ciśnienia osmotycznego i pH, dokonano korekty składu buforów cytrynianowych włączonych do receptury kropli do oczu, tak aby spełniały one wymogi założone w celu pracy.
1R i IR	Zbadanie wpływu zastosowanych buforów cytrynianowych na właściwości fizykochemiczne i trwałość cefuroksymu sodowego w 1 % i 5 % (w/w) kroplach, przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni.
2R i IIR	Zbadanie wpływu zastosowanych środków konserwujących: boranu fenylortęciowego i alkoholu β-fenyloetylowego na właściwości fizykochemiczne i trwałość cefuroksymu sodowego w 1 % i 5 % (w/w) buforowanych kroplach, przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni.
3R i IIIR	Zbadanie wpływu alkoholu poliwinylowego na właściwości fizykochemiczne i trwałość cefuroksymu sodowego w 1 % i 5 % (w/w) buforowanych kroplach do oczu, przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni.
4R i IVR	Zbadanie wpływu alkoholu poliwinylowego na właściwości fizykochemiczne i trwałość cefuroksymu sodowego w 1 % i 5 % (w/w) buforowanych i konserwowanych kroplach do oczu, przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni.

8.3. Tok postępowania przy sporządzaniu kropli do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych oraz roztworów wodnych antybiotyku według składu przedstawionego w tabeli 15.

- **1 % i 5 % roztwory wodne cefuroksymu – wersje nr $0_{(1\%)}$ i nr $0_{(5\%)}$.**

  W warunkach aseptycznych do wytarowanej jałowej zlewki odważono 1,0 g lub 5,0 g preparatu Biofuroksym, z dokładnością do 0,001g. Następnie dodano przepisaną ilość wody do injekcji. Po wymieszaniu roztwór przesączono przez sączek membranowy o średnicy porów 0,22 μm ± 0,01 μm do jałowych butelek infuzyjnych o pojemności 100 mL, które zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami.

- **1 % i 5 % buforowane krople do oczu – wersje recepturowe nr 1R i nr IR.**

  W warunkach aseptycznych do wytarowanej jałowej zlewki odważono 1,0 g lub 5,0 g preparatu Biofuroksym, z dokładnością do 0,001g. Następnie dodano przepisaną ilość buforu cytrynianowego nr II lub nr I. Po wymieszaniu krople przesączono przez sączek membranowy o średnicy porów 0,22 μm ± 0,01 μm do jałowych butelek infuzyjnych o pojemności 100 mL, które zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami.

- **1 % i 5 % buforowane i konserwowane krople do oczu – wersje recepturowe nr 2R i nr IIR.**

  W warunkach aseptycznych do wytarowanej jałowej zlewki odważono 1,0 g lub 5,0 g preparatu Biofuroksym, z dokładnością do 0,001g. Następnie dodano przepisaną ilość buforu cytrynianowego nr II lub nr I i zakonserwowano 0,04 % roztworem pomocniczym boranu fenylortęciowy oraz alkoholem β-fenyloetylowym. Po wymieszaniu krople przesączono przez sączek membranowy o średnicy porów0,22 μm ± 0,01 μm do jałowych butelek infuzyjnych o pojemności 100 mL, które zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami.

- **1 % i 5 % buforowane krople do oczu o zwiększonej lepkości – wersje recepturowe nr 3R i nr IIIR.**

  W warunkach aseptycznych do wytarowanej jałowej zlewki odważono 1,0 g lub 5,0 g preparatu Biofuroksym, z dokładnością do 0,001g. Następnie dodano przepisaną ilość buforu cytrynianowego nr III lub nr II. Po wymieszaniu krople przesączono przez sączek membranowy o średnicy porów 0,22 μm ± 0,01 μm do jałowej zlewki i dodano przepisaną ilość roztworu PVA o lepkości $\eta = 42{,}31$ mPa•s. Następnie krople wymieszano i rozlano do jałowych butelek infuzyjnych o pojemności 100 mL, które zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami.

- **1 % i 5 % buforowane i konserwowane krople do oczu o zwiększonej lepkości – wersje recepturowe nr 4R i nr IVR.**

  W warunkach aseptycznych do wytarowanej jałowej zlewki odważono 0,001g, 1,0 g lub 5,0 g preparatu Biofuroksym, z dokładnością do 0,001g. Następnie dodano przepisaną ilość buforu cytrynianowego nr III lub nr II i zakonserwowano 0,04 % roztworem pomocniczym boranu fenylortęciowego oraz alkoholem β-fenyloetylowym. Po wymieszaniu krople przesączono przez sączek membranowy o średnicy porów 0,22 μm ± 0,01 μm do jałowej zlewki i dodano przepisaną ilość roztworu PVA o lepkości $\eta = 42{,}31$ mPa•s. Następnie wymieszano i rozlano krople do jałowych butelek infuzyjnych o pojemności 100 mL, które zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami.

Wszystkie wersje recepturowe kropli sporządzono w dwóch seriach i przechowywano w chłodziarkach farmaceutycznych w temperaturze 4 °C i 20 °C przez 30 dni, chroniąc od światła. W tym czasie badano właściwości fizyczne kropli oraz trwałość cefuroksymu sodowego za pomocą metody HPLC.

9. Aseptyczne sporządzanie 1 % i 5 % (w/w) kropli do oczu z cefuroksymem sodu w wersjach „przemysłowych”.

Krople do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych” sporządzono w warunkach aseptycznych, zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 7. Do wykonania kropli użyto rozpuszczalników „przemysłowych” świeżo sporządzonych oraz rozpuszczalników poddanych testowi przyspieszonego starzenia. Analogicznie jak wersje recepturowe, „przemysłowe” wersje kropli do oczu z cefuroksymem wykonano w dwóch seriach. Z uwagi na ograniczoną trwałość antybiotyku w roztworach wodnych i kroplach recepturowych przechowywanych w temperaturze 20 ^{0}C oraz fakt, że badania w tych warunkach były prowadzone tylko w celach porównawczych, dalszą analizę nad właściwościami fizykochemicznymi i trwałością cefuroksymu sodowego w kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych” prowadzono tylko w temperaturze przechowywania 4 ^{0}C.

9.1. Skład „przemysłowych” wersji kropli do oczu.

W tabeli 17 przedstawiono skład wykonanych 1 % i 5 % (w/w) wersji „przemysłowych” kropli do oczu z cefuroksymem sodowym. W celu odróżnienia kropli sporządzonych na świeżych rozpuszczalnikach od kropli wykonanych na rozpuszczalnikach poddanych procesowi przyspieszonego starzenia, przez okres 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 ^{0}C ± 2ºC / 75 % RH ± 5% RH, wprowadzono następujące oznaczenia dla poszczególnych wersji:

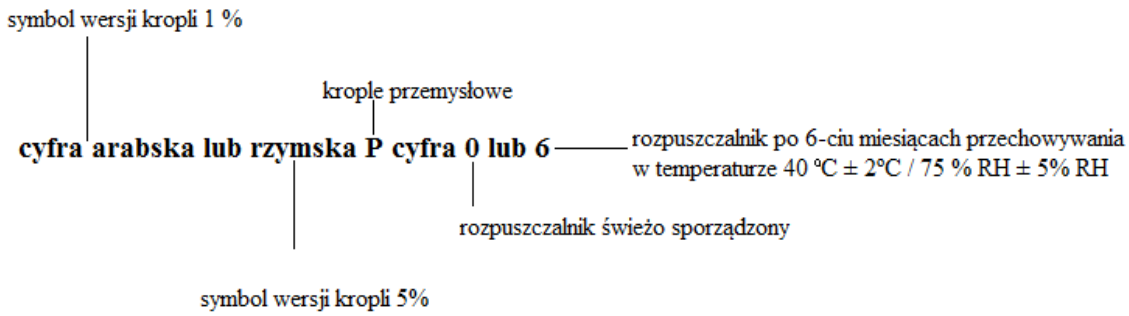


Tabela 17. Skład 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych”, sporządzonych na świeżo wykonanych rozpuszczalnikach oraz na rozpuszczalnikach przechowywanych przez 6 miesięcy w warunkach przyspieszonego starzenia w temperaturze 40 ^{0}C ± 2ºC / 75 % RH ± 5% RH.

Skład kropli	**1 % (w/w)**				**5 % (w/w)**			
	Symbol wersji							
	1P0 i 1P6	**2P0 i 2P6**	**3P0 i 3P6**	**4P0 i 4P6**	**IP0 i IP6**	**IIP0 i IIP6**	**IIIP0 i IIIP6**	**IVP0 i IVP6**
Biofuroksym	1,0	1,0	1,0	1,0	5,0	5,0	5,0	5,0
rozpuszczalnik nr 1	99,0	-	-	-	-	-	-	-
rozpuszczalnik nr 2	-	99,0	-	-	-	-	-	-
rozpuszczalnik nr 3	-	-	99,0	-	-	-	-	-
rozpuszczalnik nr 4	-	-	-	99,0	-	-	-	-
rozpuszczalnik nr I	-	-	-	-	95,0	-	-	-
rozpuszczalnik nr II	-	-	-	-	-	95,0	-	-
rozpuszczalnik nr III	-	-	-	-	-	-	95,0	-
rozpuszczalnik nr IV	-	-	-	-	-	-	-	95,0

9.2. Sposób wykonania kropli do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych”.

W warunkach aseptycznych odważono, z dokładnością do 0,001 g, 1,0 g lub 5,0 g cefuroksymu sodowego bezpośrednio do wyjałowionej zlewki i dodano odpowiednią ilość rozpuszczalników przeznaczonych do wersji „przemysłowych” kropli, według składu przedstawionego w tabeli 17. Krople mieszano do rozpuszczenia substancji, a następnie przelano do wyjałowionych butelek infuzyjnych o pojemności 100 mL i zamknięto gumowym korkiem i metalowym kapslem. W odróżnieniu od sposobu sporządzania kropli recepturowych, pominięto tutaj etap sączenia mikrobiologicznego przez sączek 0,22 μm ± 0,01 μm. Ponadto skrócono czas wykonania kropli, wykluczając kilka etapów związanych najpierw z rozpuszczeniem cefalosporyny w buforach, a następnie konserwowaniem, czy też zwiększaniem lepkości kropli poprzez wprowadzenie roztworu pomocniczego alkoholu poliwinylowego.

Wszystkie krople do oczu w wersjach przemysłowych sporządzono w dwóch seriach i przechowywano w chłodziarkach farmaceutycznych w temperaturze 4 °C przez 30 dni, chroniąc od światła. W tym czasie badano właściwości fizyczne kropli oraz trwałość cefuroksymu sodowego za pomocą metody HPLC.

10. Ocena fizyczna 1 % i 5 % (w/w) roztworów wodnych cefuroksymu sodowego i kropli do oczu w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C oraz kropli do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C.

10.1. pH kropli.

pH roztworów wodnych cefuroksymu sodowego oraz kropli w wersjach recepturowych i „przemysłowych" mierzono w 3-dniowych odstępach czasu. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią z dwóch niezależnie wykonanych serii kropli. Dla każdej serii wykonano po trzy pomiary, a następnie wyliczono średnią i odchylenie standardowe pojedynczego wyniku dla n = 6.

Wyniki badań pH 1 % i 5 % (w/w) roztworów wodnych antybiotyku i kropli recepturowych, zarówno świeżo sporządzonych jak i przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni, przedstawiono w tabelach 18 i 19 oraz na rycinach 13 – 18.

Zmiany pH w 1 % i 5 % (w/w) kroplach z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych" sporządzonych na świeżo wykonanych rozpuszczalnikach, w trakcie przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni, przedstawiono w tabeli 20 oraz na rycinach 19 i 20.

Wyniki badań pH 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", sporządzonych na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej przyśpieszonemu starzeniu przez okres 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 ^{0} ± 2 ^{0}C/75 RH ± 5 RH, zarówno w dniu wykonania kropli jak i w trakcie przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni, przedstawiono w tabeli 21 oraz na rycinach 21 i 22.

10.2. Ciśnienie osmotyczne.

Pomiar ciśnienia osmotycznego roztworów wodnych cefuroksymu sodowego oraz kropli w wersjach recepturowych i „przemysłowych" wykonywano na osmometrze w 3-dniowych odstępach czasu. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią z dwóch niezależnie wykonanych serii kropli. Dla każdej serii wykonano po trzy pomiary, a następnie wyliczono średnią i odchylenie standardowe pojedynczego wyniku dla n = 6.

Wyniki badań ciśnienia osmotycznego 1 % i 5 % (w/w) roztworów wodnych antybiotyku i kropli recepturowych, zarówno świeżo sporządzonych jak i przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni, przedstawiono w tabelach 22 i 23 oraz na rycinach 23 – 28.

Zmiany ciśnienia osmotycznego w 1 % i 5 % (w/w) kroplach z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", sporządzonych na świeżo wykonanych rozpuszczalnikach, w trakcie przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni, przedstawiono w tabeli 24 oraz na rycinach 29 i 30.

Wyniki badań ciśnienia osmotycznego 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", sporządzonych na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej przyśpieszonemu starzeniu przez okres 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 ^{0}C ± 2 ^{0}C/75 RH ± 5 RH, w dniu wykonania kropli jak i w trakcie przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni, przedstawiono w tabeli 25 oraz na rycinach 31 i 32.

10.3. Lepkość i gęstość kropli.

Pomiar gęstości i lepkości wykonano we wszystkich wersjach kropli, których lepkość zmodyfikowano poprzez wprowadzenie do ich składu roztworu alkoholu poliwinylowego (PVA). Lepkość zmierzono na wiskozymetrze Hőpplera w dniu sporządzenia kropli oraz w 30 dniu ich przechowywania. Równocześnie na densytometrze wyznaczono gęstość kropli. Każdą próbę mierzono trzykrotnie. Wyniki pomiaru przedstawiono jako wartość średnią (dla n = 3) i odchylenie standardowe pojedynczego wyniku .

Wyniki badań lepkości i gęstości 1% i 5 % (w/w) kropli recepturowych w wersji 3R i 4R oraz IIIR i IVR, świeżo sporządzonych jak i po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C, przedstawiono w tabeli 26.

Wyniki badań lepkości i gęstości 1% i 5 % (w/w) kropli „przemysłowych" z cefuroksymem sodowym w wersji 3P0 i 4P0 oraz IIIP0 i IVP0, sporządzonych na świeżo wykonanych rozpuszczalnikach, przedstawiono w tabeli 27.

Wyniki badań lepkości i gęstości 1% i 5 % (w/w) kropli „przemysłowych" z cefuroksymem sodowym w wersji 3P6 i 4P6 oraz IIIP6 i IVP6, sporządzonych na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej przyśpieszonemu starzeniu przez okres 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 ^{0}C ± 2 ^{0}C/75 RH ± 5 RH, przedstawiono w tabeli 28.

10.4. Badania organoleptyczne.

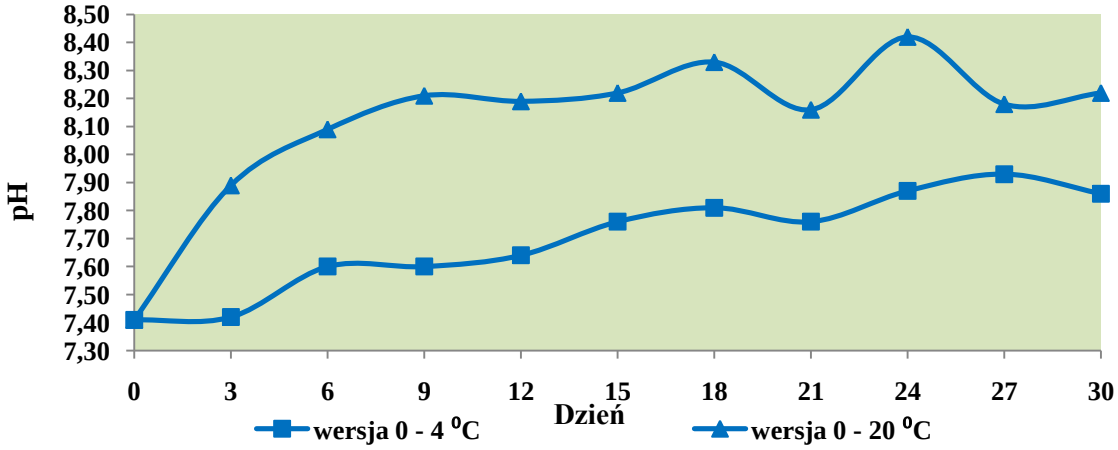
W ramach badań organoleptycznych oceniono barwę, klarowność i zapach roztworów wodnych antybiotyku, kropli w wersjach recepturowych oraz kroplach w wersjach „przemysłowych", zarówno świeżo sporządzonych, jak i przechowywanych przez 30 dni. Wyniki badań zestawiono w tabelach 29 i 30.

Tabela 18. Zmiana wartości pH w 1 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych i w wodnych roztworach antybiotyku, przechowywanych w temperaturze 4 °C oraz 20 °C.

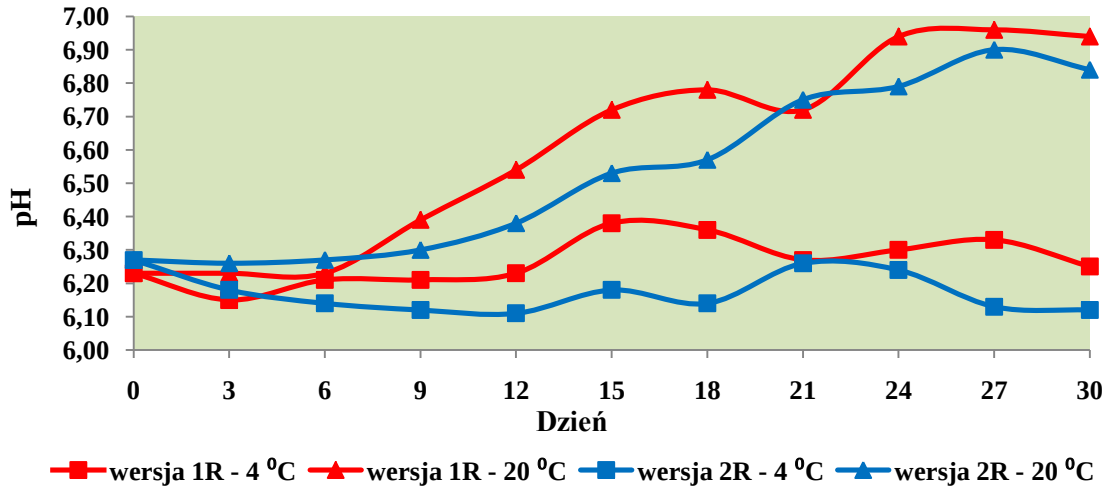
pH												
Symbol wersji recepturowej	**Temp.**	**Dzień 0**	**Dzień 3**	**Dzień 6**	**Dzień 9**	**Dzień 12**	**Dzień 15**	**Dzień 18**	**Dzień 21**	**Dzień 24**	**Dzień 27**	**Dzień 30**
$0_{(1\%)}$	**4 ˚C**	7,41 ± 0,03	7,42 ± 0,01	7,60 ± 0,17	7,60 ± 0,09	7,64 ± 0,05	7,76 ± 0,07	7,81 ± 0,23	7,76 ± 0,04	7,87 ±0,10	7,93 ± 0,06	7,86 ± 0,01
	20 ˚C		7,89 ± 0,13	8,09 ± 0,10	8,21 ± 0,01	8,19 ± 0,03	8,22 ± 0,18	8,33 ± 0,16	8,16 ± 0,11	8,42± 0,13	8,18 ± 0,03	8,22 ± 0,08
1R	**4 ˚C**	6,23 ± 0,01	6,15 ± 0,04	6,21 ± 0,02	6,21 ± 0,02	6,23± 0,01	6,38± 0,01	6,36 ± 0,01	6,27 ± 0,01	6,30 ± 0,01	6,33 ± 0,01	6,25 ± 0,01
	20 ˚C		6,23 ± 0,02	6,23 ± 0,01	6,39 ±0,07	6,54 ± 0,04	6,72 ± 0,01	6,78 ± 0,03	6,72 ± 0,02	6,94 ± 0,05	6,96 ± 0,00	6,94 ± 0,06
2R	**4 ˚C**	6,27 ± 0,00	6,18 ± 0,01	6,14 ± 0,01	6,12 ± 0,03	6,11 ± 0,01	6,18 ± 0,01	6,14 ± 0,01	6,26 ± 0,01	6,24 ± 0,04	6,13 ± 0,02	6,12 ± 0,02
	20 ˚C		6,26 ± 0,02	6,27 ± 0,01	6,30 ± 0,01	6,38 ± 0,02	6,53 ± 0,01	6,57 ± 0,03	6,75 ± 0,01	6,79 ± 0,01	6,90 ± 0,00	6,84 ± 0,01
3R	**4 ˚C**	6,24 ± 0,07	6,42 ± 0,07	6,10 ± 0,00	6,10 ± 0,00	6,30 ± 0,02	6,24 ± 0,02	6,21 ± 0,01	6,22 ± 0,01	6,30 ± 0,00	6,38 ± 0,02	6,35 ± 0,03
	20 ˚C		6,35 ± 0,02	6,25 ± 0,05	6,20 ± 0,00	6,52 ± 0,01	6,52 ± 0,01	6,53 ± 0,03	6,57 ± 0,01	6,75 ± 0,06	6,88 ± 0,03	7,07 ± 0,04
4R	**4 ˚C**	6,23 ± 0,02	6,30 ± 0,01	6,14 ± 0,04	6,00 ± 0,00	6,25 ± 0,00	6,21 ± 0,00	6,19 ± 0,00	6,20 ± 0,01	6,30 ± 0,00	6,41 ± 0,04	6,40 ± 0,03
	20 ˚C		6,36 ± 0,02	6,25 ± 0,05	6,25 ± 0,05	6,53 ± 0,02	6,53 ± 0,01	6,59 ± 0,03	6,58 ± 0,02	6,75 ± 0,05	6,96 ± 0,00	7,03 ± 0,08

Tabela 19. Zmiana wartości pH w 5 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych i w wodnych roztworach antybiotyku, przechowywanych w temperaturze 4 °C oraz 20 °C.

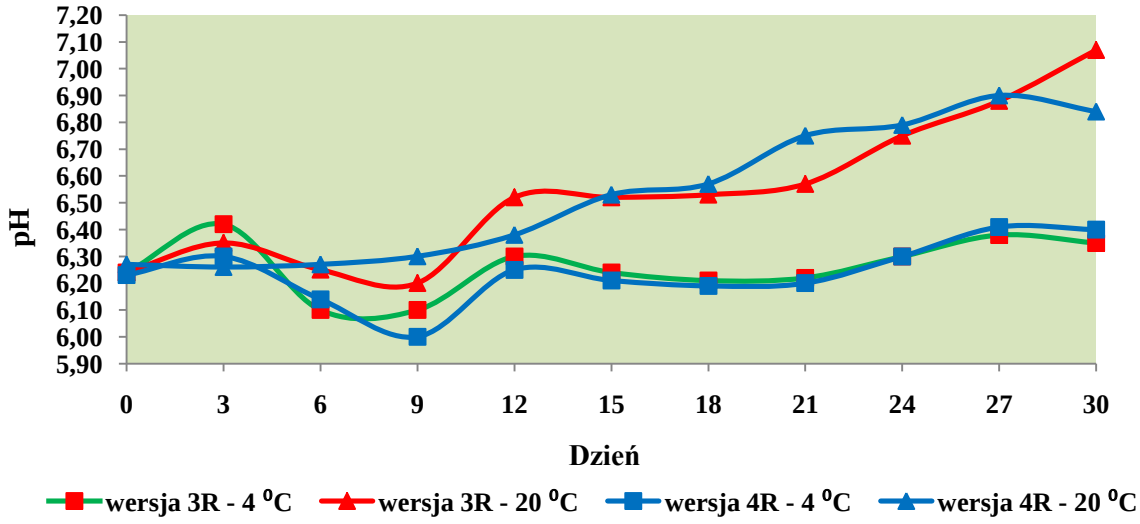
pH												
Symbol wersji recepturowej	**Temp.**	**Dzień 0**	**Dzień 3**	**Dzień 6**	**Dzień 9**	**Dzień 12**	**Dzień 15**	**Dzień 18**	**Dzień 21**	**Dzień 24**	**Dzień 27**	**Dzień 30**
$0_{(5\%)}$	**4 ˚C**	8,03 ± 0,08	7,97 ± 0,04	8,00 ± 0,08	8,17 ± 0,02	8,21 ± 0,01	8,35 ± 0,02	8,39 ± 0,05	8,29 ± 0,04	8,29 ± 0,02	8,27 ± 0,02	8,41 ± 0,01
	20 ˚C		8,22 ± 0,09	8,24 ± 0,02	8,47 ± 0,00	8,57 ± 0,03	8,66 ± 0,03	8,76 ± 0,01	8,46 ± 0,06	8,55 ± 0,03	8,54 ± 0,01	8,66 ± 0,01
IR	**4 ˚C**	6,26 ± 0,01	6,41 ± 0,09	6,50 ± 0,14	6,56 ± 0,10	6,89 ± 0,02	6,97 ± 0,14	7,20 ± 0,01	7,36 ± 0,11	7,49 ± 0,02	7,66 ± 0,05	7,83 ± 0,02
	20 ˚C		7,48 ± 0,04	7,98 ± 0,16	8,05 ± 0,04	8,22 ± 0,08	8,36 ± 0,01	8,28 ± 0,03	8,30 ± 0,02	8,34 ± 0,07	8,37 ± 0,08	8,54 ± 0,03
IIR	**4 ˚C**	6,15 ± 0,00	6,35 ± 0,02	6,40 ± 0,01	6,63 ± 0,02	7,03 ± 0,01	7,32 ± 0,05	7,16 ± 0,15	7,26 ± 0,02	7,29 ± 0,00	7,32 ± 0,01	7,35 ± 0,05
	20 ˚C		7,49 ± 0,10	7,63 ± 0,07	8,04 ± 0,02	8,10 ± 0,01	8,19 ± 0,01	8,06 ± 0,05	8,03 ± 0,05	8,17 ± 0,01	8,20 ± 0,02	8,24 ± 0,03
IIIR	**4 ˚C**	6,28 ± 0,01	6,26 ± 0,01	6,34 ± 0,01	6,45 ± 0,03	6,58 ± 0,07	6,49 ± 0,03	6,67 ± 0,00	6,84 ± 0,00	7,10 ± 0,00	7,34 ± 0,02	7,18 ± 0,02
	20 ˚C		7,55 ± 0,01	8,12 ± 0,01	8,33 ± 0,01	8,64 ± 0,05	8,62 ± 0,12	8,84 ± 0,01	8,90 ± 0,01	8,83 ± 0,02	8,77 ± 0,05	8,83 ± 0,02
IVR	**4 ˚C**	6,24 ± 0,01	6,31 ± 0,01	6,33 ± 0,01	6,48 ± 0,02	6,60 ± 0,05	6,62 ± 0,06	6,70 ± 0,01	6,92 ± 0,01	7,16 ± 0,01	7,35 ± 0,02	7,23 ± 0,02
	20 ˚C		7,67 ± 0,06	8,10 ± 0,02	8,30 ± 0,00	8,56 ± 0,01	8,62 ± 0,06	8,78 ± 0,01	8,65 ± 0,02	8,76 ± 0,04	8,68 ± 0,01	8,78 ± 0,02



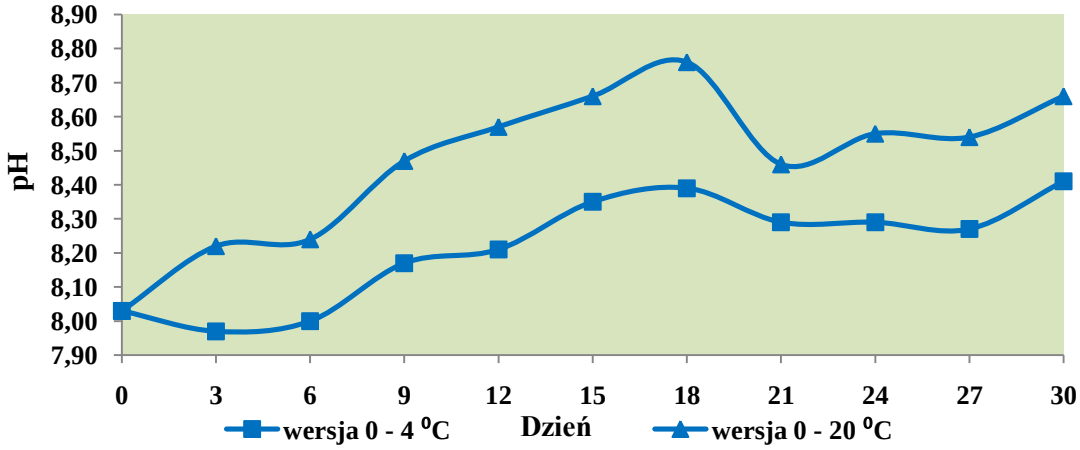
Rycina 13. Zmiana wartości pH w 1 % roztworach wodnych cefuroksymu sodowego, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni.



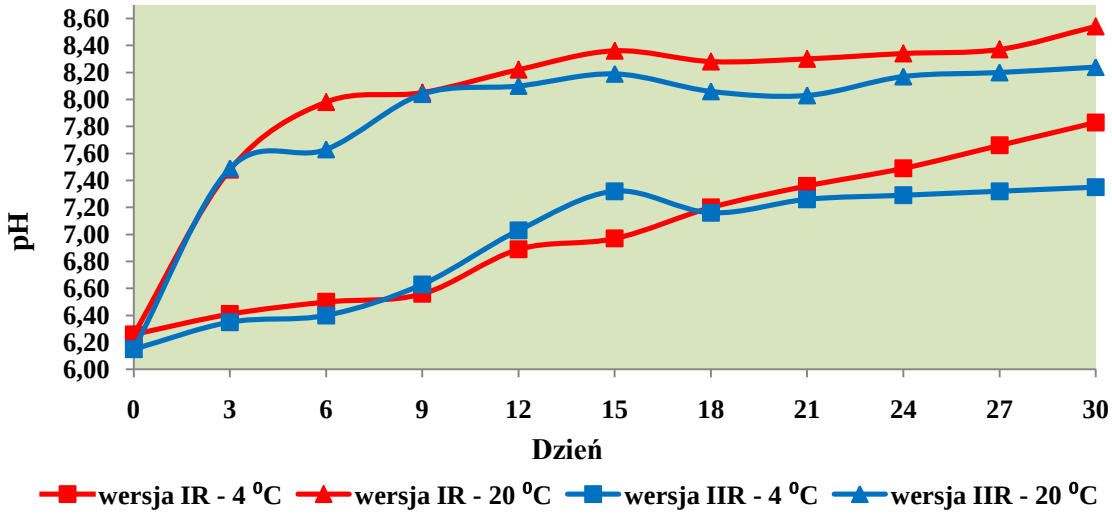
Rycina 14. Zmiana wartości pH w 1 % kroplach recepturowych z cefuroksymem sodowym w wersjach 1R i 2R, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni.



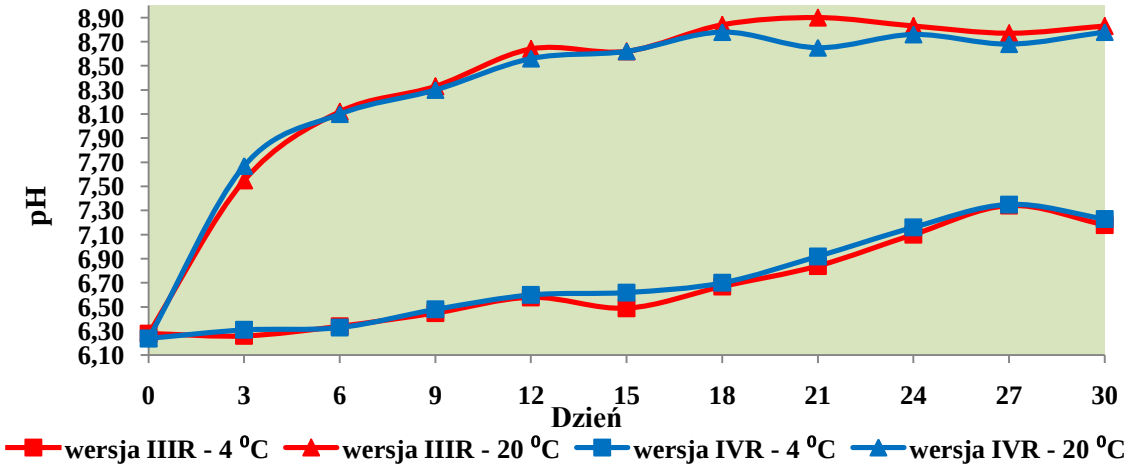
Rycina 15. Zmiana wartości pH w 1 % kroplach recepturowych z cefuroksymem sodowym w wersjach 3R i 4R, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni.



Rycina 16. Zmiana wartości pH w 5 % roztworach wodnych cefuroksymu sodowego, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni.



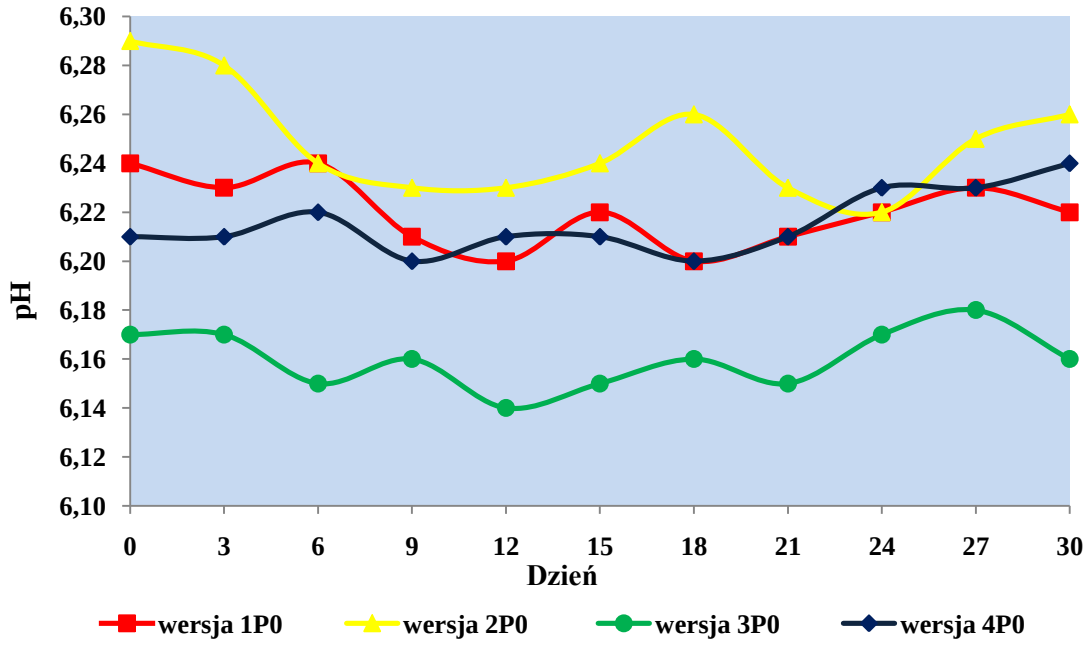
Rycina 17. Zmiana wartości pH w 5 % kroplach recepturowych z cefuroksymem sodowym w wersjach IR i IIR, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni.



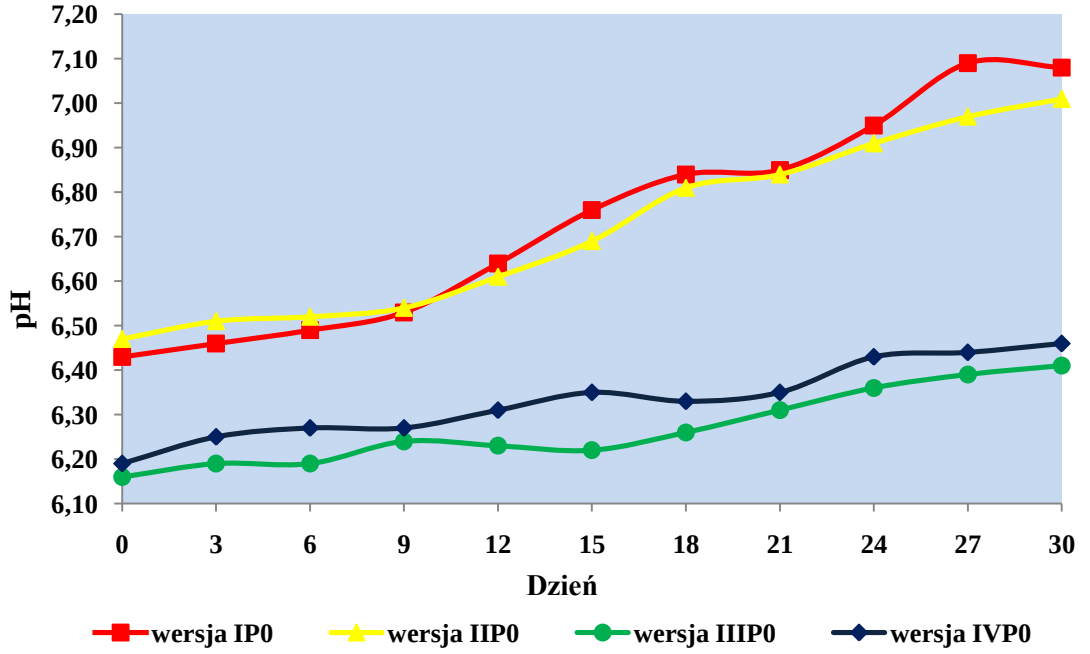
Rycina 18. Zmiana wartości pH w 5 % kroplach recepturowych z cefuroksymem sodowym w wersjach IIIR i IVR, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni.

Tabela 20. Zmiana wartości pH w 1 % i 5 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych”, sporządzonych na świeżo wykonanych rozpuszczalnikach, przechowywanych w temperaturze 4 °C.

pH												
Symbol wersji przemysłowej	**Temp.**	**Dzień 0**	**Dzień 3**	**Dzień 6**	**Dzień 9**	**Dzień 12**	**Dzień 15**	**Dzień 18**	**Dzień 21**	**Dzień 24**	**Dzień 27**	**Dzień 30**
1P0	**4 °C**	6,24 ± 0,02	6,23 ± 0,01	6,24 ± 0,02	6,21 ± 0,01	6,20 ± 0,01	6,22 ± 0,01	6,20 ± 0,02	6,21 ± 0,01	6,22 ± 0,01	6,23 ± 0,01	6,22 ± 0,01
2P0		6,29 ± 0,01	6,28 ± 0,02	6,24 ± 0,01	6,23 ± 0,01	6,23 ± 0,02	6,24 ± 0,00	6,26 ± 0,01	6,23 ± 0,01	6,22 ± 0,01	6,25 ± 0,01	6,26 ± 0,01
3P0		6,17 ± 0,02	6,17 ± 0,01	6,15 ± 0,00	6,16 ± 0,01	6,14 ± 0,01	6,15 ± 0,03	6,16 ± 0,02	6,15 ± 0,01	6,17 ± 0,02	6,18 ± 0,01	6,16 ± 0,02
4P0		6,21 ± 0,02	6,21 ± 0,02	6,22 ± 0,02	6,20 ± 0,01	6,21 ± 0,02	6,21 ± 0,01	6,20 ± 0,01	6,21 ± 0,02	6,23 ± 0,01	6,23 ± 0,02	6,24 ± 0,02
IP0	**4 °C**	6,43 ± 0,01	6,46± 0,03	6,49 ± 0,02	6,53 ± 0,03	6,64 ± 0,03	6,76 ± 0,02	6,84 ± 0,05	6,85 ± 0,01	6,95 ± 0,04	7,09 ± 0,01	7,08 ± 0,02
IIP0		6,47 ± 0,01	6,51± 0,01	6,52 ± 0,02	6,54 ± 0,01	6,61 ± 0,01	6,69 ± 0,01	6,81 ± 0,01	6,84 ± 0,01	6,91± 0,05	6,97 ± 0,01	7,01 ± 0,01
IIIP0		6,16 ± 0,01	6,19 ± 0,01	6,19 ± 0,01	6,24 ± 0,02	6,23 ± 0,01	6,22 ± 0,01	6,26 ± 0,02	6,31 ± 0,01	6,36 ± 0,03	6,39 ± 0,01	6,41 ± 0,01
IVP0		6,19 ± 0,01	6,25 ± 0,01	6,27 ± 0,02	6,27 ± 0,03	6,31 ± 0,01	6,35 ± 0,01	6,33 ± 0,01	6,35 ± 0,01	6,43 ± 0,01	6,44 ± 0,01	6,46 ± 0,01



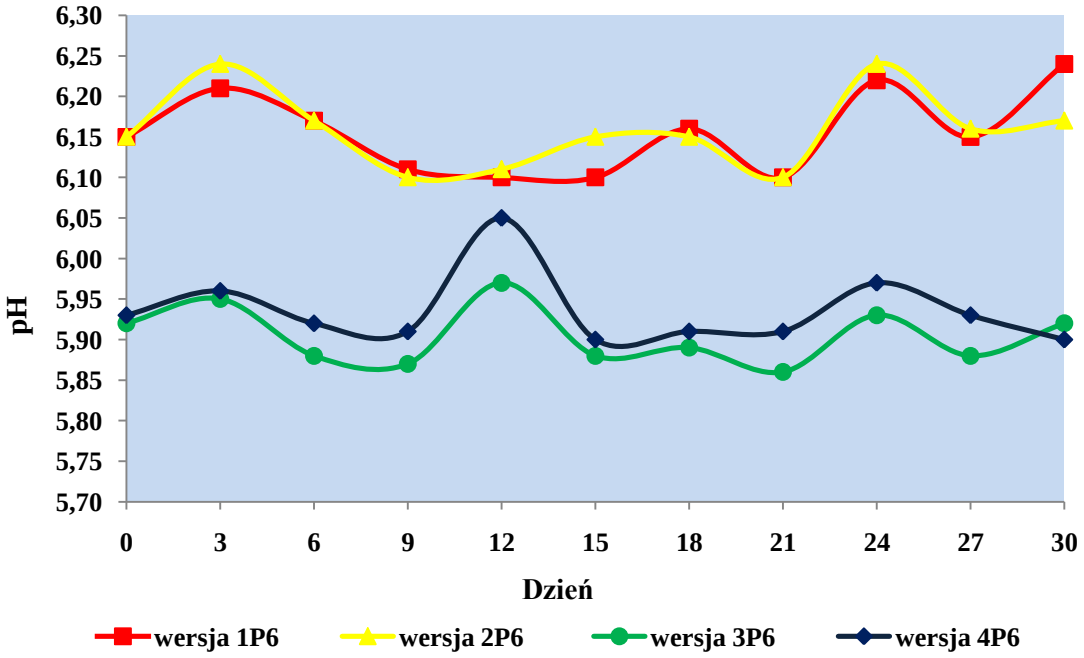
Rycina 19. Zmiana wartości pH w 1 % kroplach „przemysłowych" z cefuroksymem sodowym w wersjach P0, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni.



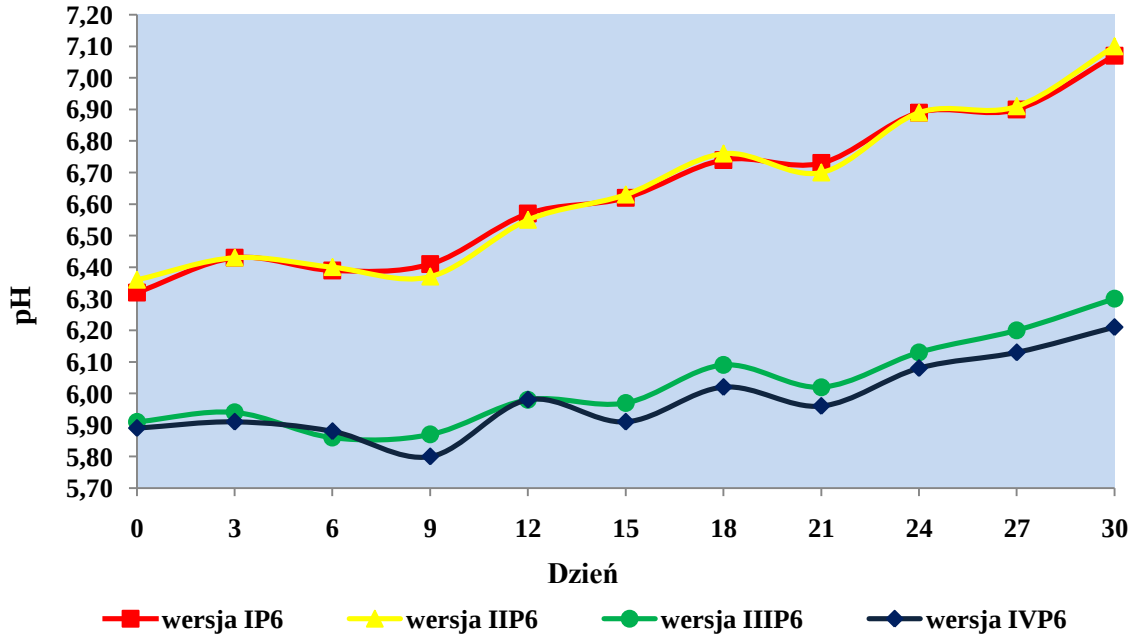
Rycina 20. Zmiana wartości pH w 5 % kroplach „przemysłowych" z cefuroksymem sodowym w wersjach P0, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni.

Tabela 21. Zmiana wartości pH w 1 % i 5% (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych”, sporządzonych na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej testowi przyspieszonego starzenia (6 miesięcy, 40 ^{0}C ± 2 ^{0}C/75 RH ± 5 RH), przechowywanych w temperaturze 4 °C.

pH												
Symbol wersji przemysłowej	**Temp.**	**Dzień 0**	**Dzień 3**	**Dzień 6**	**Dzień 9**	**Dzień 12**	**Dzień 15**	**Dzień 18**	**Dzień 21**	**Dzień 24**	**Dzień 27**	**Dzień 30**
1P6	**4 ˚C**	6,15 ± 0,01	6,21 ± 0,01	6,17 ± 0,02	6,11 ± 0,01	6,10 ± 0,01	6,10 ± 0,02	6,16 ± 0,01	6,10 ± 0,01	6,22 ± 0,01	6,15 ± 0,01	6,24 ± 0,01
2P6		6,15 ± 0,01	6,24 ± 0,03	6,17 ± 0,03	6,10 ± 0,01	6,11 ± 0,01	6,15 ± 0,02	6,15 ± 0,01	6,10 ± 0,01	6,24 ± 0,01	6,16 ± 0,01	6,17 ± 0,01
3P6	**4 ˚C**	5,92 ± 0,02	5,95 ± 0,01	5,88 ± 0,03	5,87 ± 0,01	5,97 ± 0,03	5,88 ± 0,01	5,89 ± 0,01	5,86 ± 0,01	5,93 ± 0,02	5,88 ± 0,01	5,92 ± 0,02
4P6		5,93 ± 0,01	5,96± 0,01	5,92 ± 0,02	5,91 ± 0,01	6,05 ± 0,01	5,90 ± 0,01	5,91 ± 0,01	5,91 ± 0,01	5,97 ± 0,01	5,93 ± 0,02	5,90 ± 0,02
IP6	**4 ˚C**	6,32 ± 0,01	6,43 ± 0,01	6,39 ± 0,01	6,41 ± 0,01	6,57 ± 0,01	6,62 ± 0,01	6,74 ± 0,01	6,73 ± 0,01	6,89 ± 0,02	6,90 ± 0,01	7,07 ± 0,01
IIP6		6,36 ± 0,01	6,43 ± 0,01	6,40 ± 0,01	6,37 ± 0,01	6,55 ± 0,01	6,63 ± 0,04	6,76 ± 0,02	6,70 ± 0,01	6,89 ± 0,01	6,91 ± 0,01	7,10 ± 0,01
IIIP6	**4 ˚C**	5,91 ± 0,02	5,94 ± 0,02	5,86 ± 0,01	5,87 ± 0,01	5,98 ± 0,02	5,97 ± 0,01	6,09 ± 0,01	6,02 ± 0,02	6,13 ± 0,01	6,20 ± 0,01	6,30 ± 0,02
IV6		5,89 ± 0,01	5,91 ± 0,01	5,88 ± 0,02	5,80 ± 0,06	5,98 ± 0,02	5,91 ± 0,01	6,02 ± 0,02	5,96 ± 0,02	6,08 ± 0,01	6,13 ± 0,02	6,21 ± 0,01



Rycina 21. Zmiana wartości pH w 1 % kroplach „przemysłowych" z cefuroksymem sodowym w wersjach P6, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni.



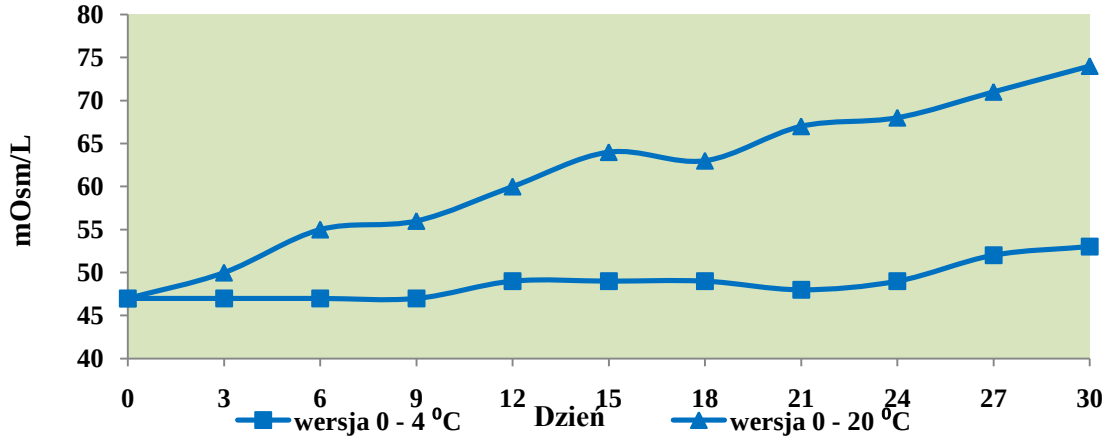
Rycina 22. Zmiana wartości pH w 5 % kroplach „przemysłowych" z cefuroksymem sodowym w wersjach P6, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni.

Tabela 22. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 1 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych i w wodnych roztworach antybiotyku, przechowywanych w temperaturze 4 °C oraz 20 °C.

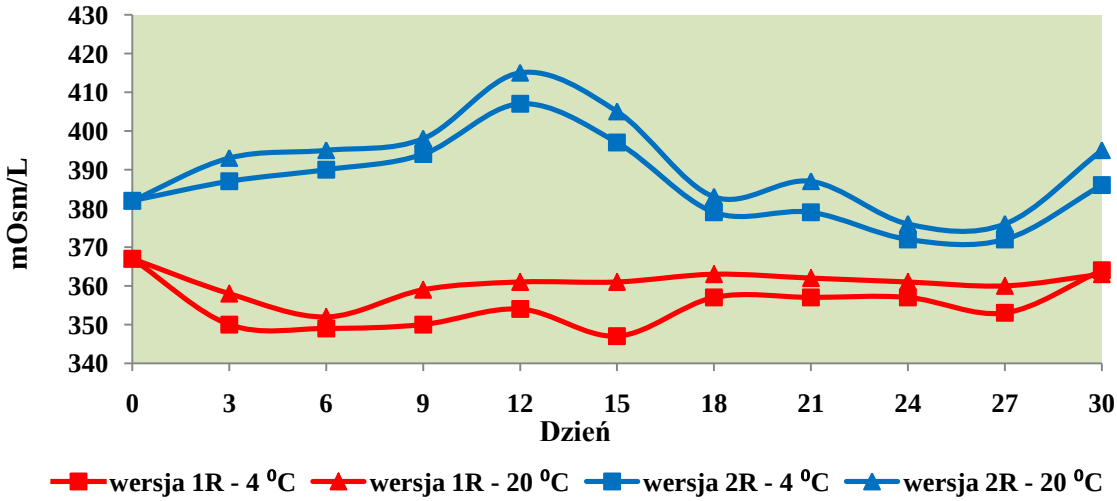
Ciśnienie osmotyczne (mOsm/L)												
Symbol wersji recepturowej	**Temp.**	**Dzień 0**	**Dzień 3**	**Dzień 6**	**Dzień 9**	**Dzień 12**	**Dzień 15**	**Dzień 18**	**Dzień 21**	**Dzień 24**	**Dzień 27**	**Dzień 30**
$0_{(1\%)}$	**4 ˚C**	47 ± 1	47 ± 1	47 ± 1	47 ± 1	49 ± 2	49 ± 3	49 ± 2	48 ± 1	49 ± 1	52 ± 1	53 ± 2
	20 ˚C		50 ± 1	55 ± 1	56 ± 1	60 ± 1	64 ± 1	63 ± 2	67 ± 1	68 ± 1	71 ± 1	74 ± 2
1R	**4 ˚C**	367 ± 2	350 ± 1	349 ± 1	350 ± 1	354 ± 5	347 ± 1	357 ± 1	357 ± 2	357 ± 2	353 ± 2	364 ± 6
	20 ˚C		358 ± 2	352 ± 2	359 ± 5	361 ± 1	361 ± 1	363 ± 1	362 ± 2	361 ± 2	360 ± 4	363 ± 2
2R	**4 ˚C**	382 ± 2	387 ± 5	390 ± 2	394 ± 2	407 ± 1	397 ± 5	379 ± 1	379 ± 1	372 ± 1	372 ± 2	386 ± 2
	20 ˚C		393 ± 3	395 ± 4	398 ± 4	415 ± 6	405 ± 2	383 ± 4	387 ± 2	376 ± 2	376 ± 1	395 ± 3
3R	**4 ˚C**	384 ± 4	386 ± 5	386 ± 2	390 ± 4	394 ± 3	399 ± 3	400 ± 2	401 ± 3	401 ± 2	401 ± 2	404 ± 2
	20 ˚C		399 ± 6	400 ± 4	402 ± 6	405 ± 4	411 ± 4	411 ± 2	414 ± 2	415 ± 2	417 ± 1	427 ± 3
4R	**4 ˚C**	418 ± 2	416 ± 2	419 ± 2	421 ± 1	423 ± 2	423 ± 5	426 ± 3	424 ± 3	425 ± 2	429 ± 1	432 ± 3
	20 ˚C		422 ± 3	429 ± 3	431 ± 3	430 ± 1	437 ± 2	439 ± 2	439 ± 2	444 ± 3	443 ± 1	451 ± 1

Tabela 23. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 5 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych i w wodnych roztworach antybiotyku, przechowywanych w temperaturze 4 °C oraz 20 °C.

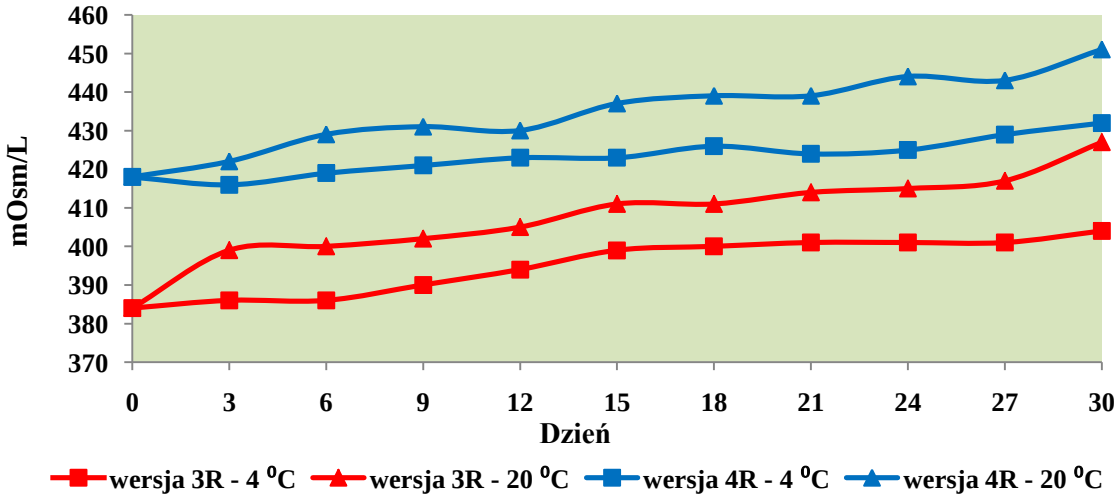
Ciśnienie osmotyczne (mOsm/L)												
Symbol wersji recepturowej	**Temp.**	**Dzień 0**	**Dzień 3**	**Dzień 6**	**Dzień 9**	**Dzień 12**	**Dzień 15**	**Dzień 18**	**Dzień 21**	**Dzień 24**	**Dzień 27**	**Dzień 30**
$0_{(5\%)}$	**4 ˚C**	221 ± 6	215 ± 2	215 ± 1	219 ± 2	220 ± 2	224 ± 1	222 ± 2	219 ± 5	231 ± 2	233 ± 4	221 ± 1
	20 ˚C		231 ± 1	248 ± 2	259 ± 2	275 ± 3	283 ± 3	288 ± 4	301 ± 1	313 ± 2	318 ± 1	323 ± 3
IR	**4 ˚C**	381 ± 15	373 ± 3	381 ± 9	379 ± 9	370 ± 4	378 ± 8	392 ± 2	395 ± 7	400 ± 1	441 ± 3	449 ± 3
	20 ˚C		376 ± 11	400 ± 4	419 ± 3	422 ± 8	431 ± 2	445 ± 9	456 ± 16	471 ± 6	481 ± 3	494 ± 3
IIR	**4 ˚C**	396 ± 3	397 ± 5	396 ± 5	394 ± 4	401 ± 2	399 ± 2	402 ± 2	406 ± 1	407 ± 4	409 ± 4	409 ± 2
	20 ˚C		416 ± 1	413 ± 3	435 ± 6	428 ± 4	446 ± 4	465 ± 2	477 ± 2	474 ± 4	484 ± 10	495 ± 9
IIIR	**4 ˚C**	390 ± 2	397 ± 3	395 ± 3	399 ± 4	397 ± 3	402 ± 7	397 ± 2	397 ± 7	398 ± 4	399 ± 2	399 ± 2
	20 ˚C		408 ± 3	416 ± 5	443 ± 5	452 ± 5	465 ± 1	469 ± 10	472 ± 1	475 ± 2	483 ± 2	493 ± 5
IVR	**4 ˚C**	430 ± 1	439 ± 2	430 ± 2	435 ± 4	437 ± 7	440 ± 10	445 ± 3	435 ± 5	430 ± 1	431 ± 4	434 ± 2
	20 ˚C		430 ± 3	450 ± 1	471 ± 2	486 ± 3	493 ± 5	511 ± 5	520 ± 2	519 ± 5	515 ± 2	536 ± 4



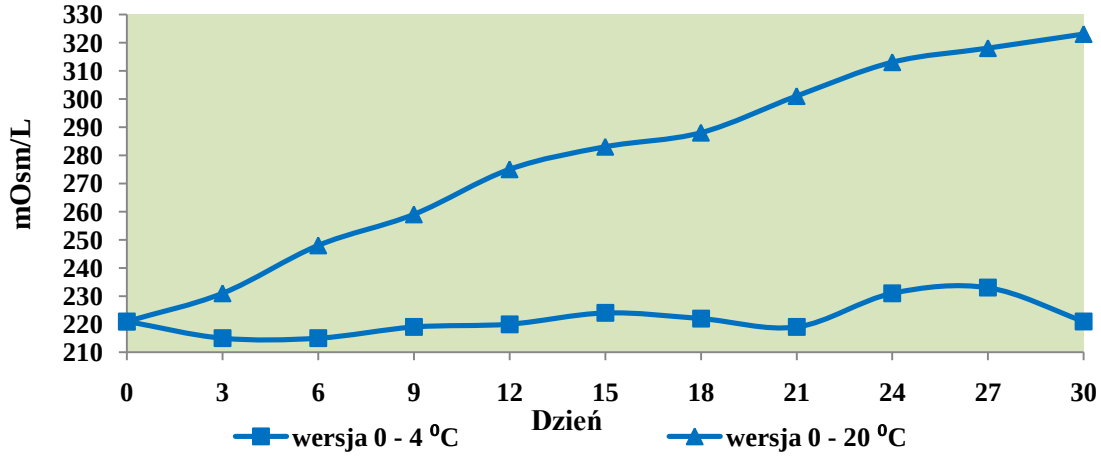
Rycina 23. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 1 % roztworach wodnych cefuroksymu sodowego, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni.



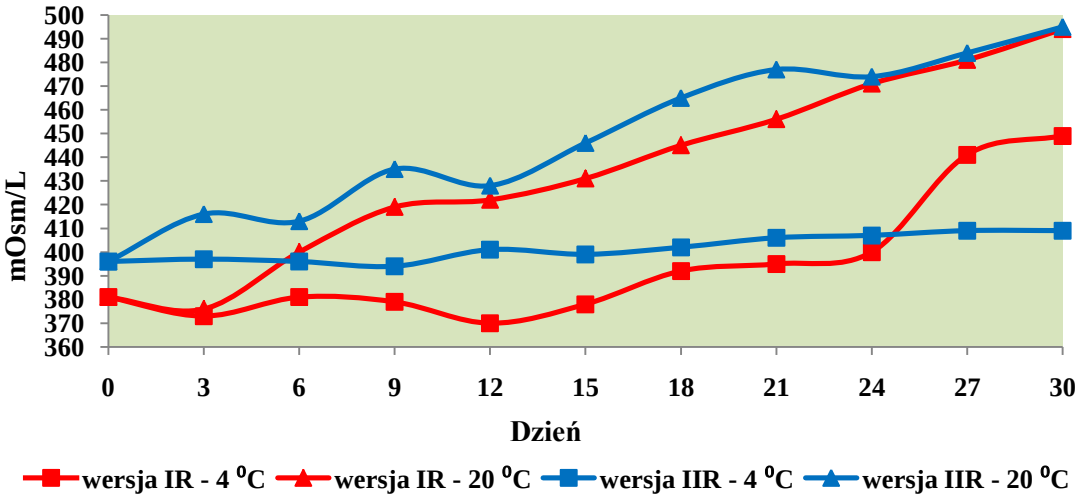
Rycina 24. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 1 % kroplach recepturowych z cefuroksymem sodowym w wersjach 1R i 2R, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni.



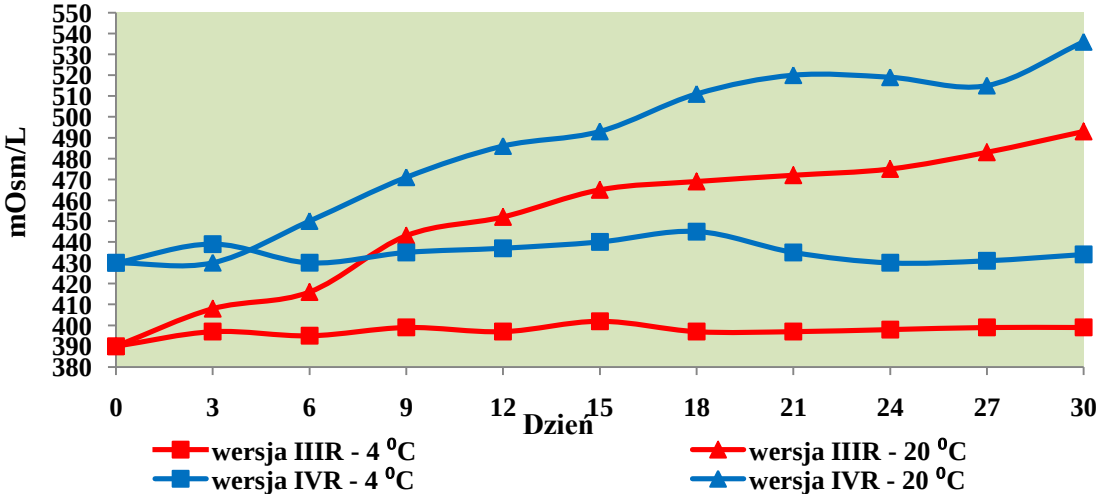
Rycina 25. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 1 % kroplach recepturowych z cefuroksymem sodowym w wersjach 3R i 4R, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni.



Rycina 26. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 5 % roztworach wodnych cefuroksymu sodowego, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni.



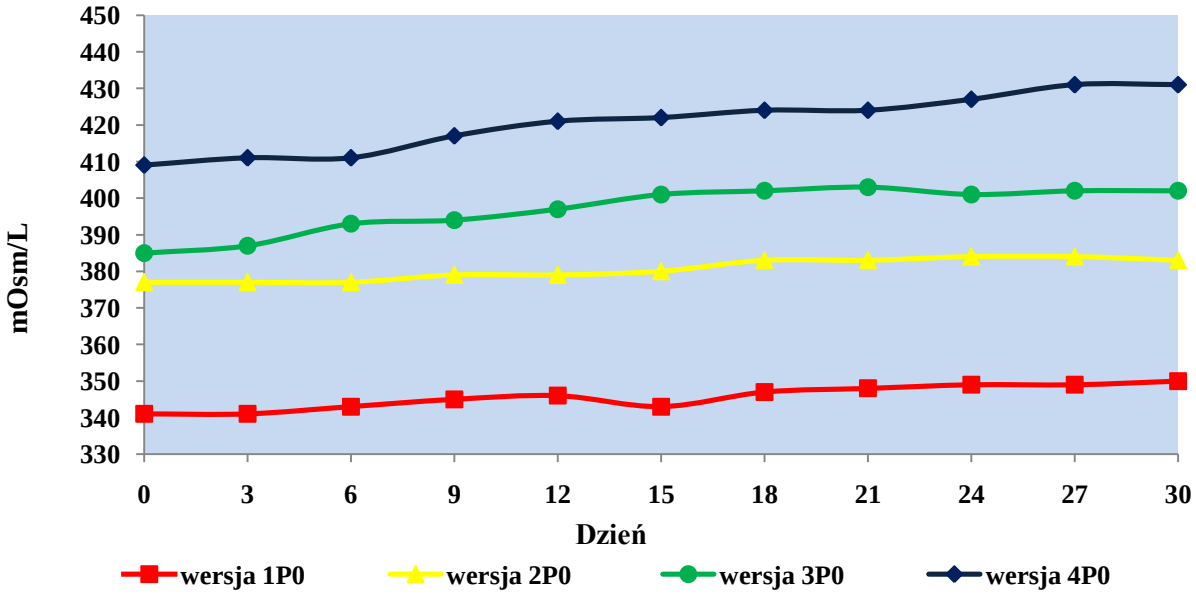
Rycina 27. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 5 % kroplach recepturowych z cefuroksymem sodowym w wersjach IR i IIR, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni.



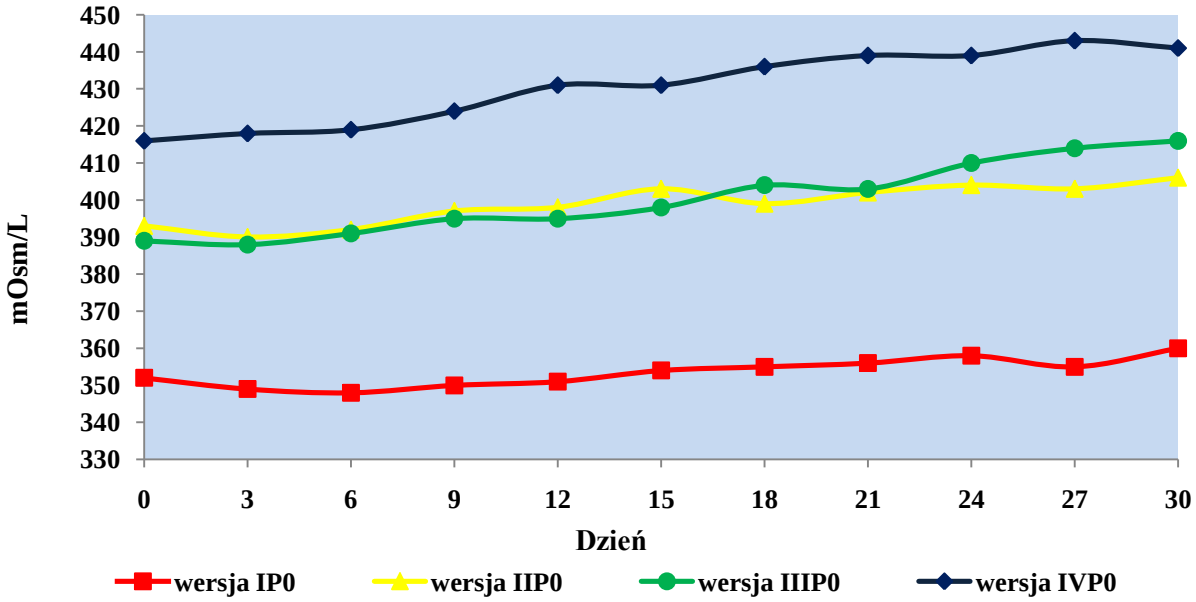
Rycina 28. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 5 % kroplach recepturowych z cefuroksymem sodowym w wersjach IIIR i IVR, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni.

Tabela 24. Zmiana wartości ciśnienienia osmotycznego w 1 % i 5 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych”, sporządzonych na świeżo wykonanych rozpuszczalnikach, przechowywanych w temperaturze 4 °C.

Ciśnienie osmotyczne (mOsm/L)												
Symbol wersji przemysłowej	**Temp.**	**Dzień 0**	**Dzień 3**	**Dzień 6**	**Dzień 9**	**Dzień 12**	**Dzień 15**	**Dzień 18**	**Dzień 21**	**Dzień 24**	**Dzień 27**	**Dzień 30**
1P0	**4 ˚C**	341 ± 1	341 ± 3	343 ± 1	345 ± 2	346 ± 2	343 ± 2	347 ± 1	348 ± 2	349 ± 1	349 ± 2	350 ± 1
2P0		377 ± 3	377 ± 3	377 ± 2	379 ± 2	379 ± 2	380 ± 3	383 ± 3	383 ± 3	384 ± 3	384 ± 3	383 ± 2
3P0		385 ± 2	387 ± 1	393 ± 3	394 ± 3	397 ± 2	401 ± 1	402 ± 2	403 ± 1	401 ± 1	402 ± 2	402 ± 2
4P0		409 ± 2	411 ± 2	411 ± 2	417 ±2	421 ± 2	422 ± 4	424 ± 1	424 ±3	427 ± 2	431 ± 3	431 ± 3
IP0	**4 ˚C**	352 ± 1	349 ± 1	348 ± 1	350 ± 2	351 ± 1	354 ± 2	355 ± 6	356 ± 3	358 ± 6	355 ± 6	360 ± 5
IIP0		393 ± 2	390 ± 3	392 ± 1	397 ± 2	398 ± 3	403 ± 4	399 ± 4	402 ± 3	404 ± 5	403 ± 2	406 ± 3
IIIP0		389 ± 2	388 ± 2	391 ± 2	395 ± 4	395 ± 4	398 ± 7	404 ± 9	403 ± 8	410 ± 6	414 ± 5	416 ± 4
IVP0		416 ± 3	418 ± 3	419 ± 3	424 ± 3	431 ± 3	431 ± 1	436 ± 3	439 ± 3	439 ± 6	443 ± 4	441 ± 3



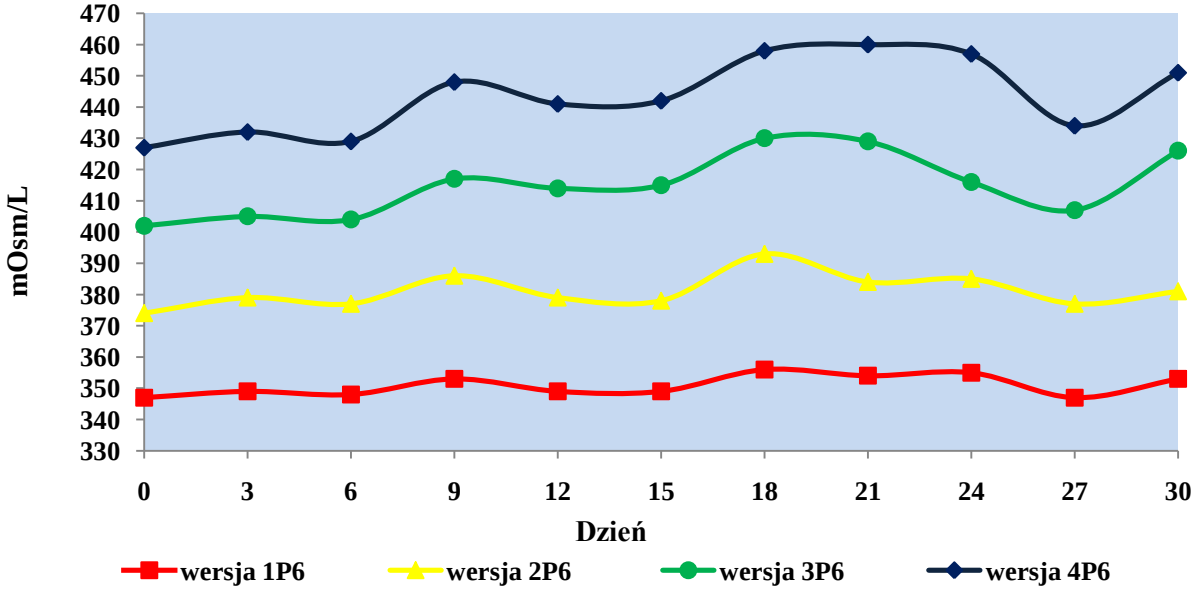
Rycina 29. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 1 % kroplach „przemysłowych” z cefuroksymem sodowym w wersjach P0, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni.



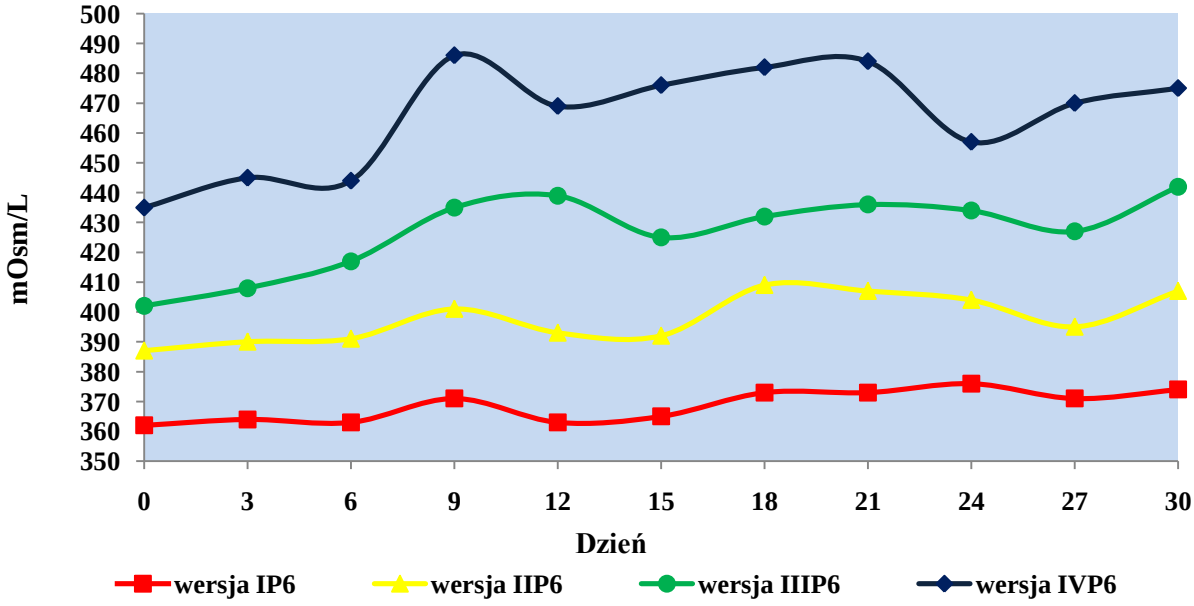
Rycina 30. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 5 % kroplach „przemysłowych” z cefuroksymem sodowym w wersjach P0, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni.

Tabela 25. Zmiana wartości ciśnienienia osmotycznego w 1 % i 5 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych”, sporządzonych na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej testowi przyspieszonego starzenia (6 miesięcy, 40 ^{0}C ± 2 ^{0}C/75 RH ±5 RH), przechowywanych w temperaturze 4 °C.

Ciśnienie osmotyczne (mOsm/L)												
Symbol wersji przemysłowej	**Temp.**	**Dzień 0**	**Dzień 3**	**Dzień 6**	**Dzień 9**	**Dzień 12**	**Dzień 15**	**Dzień 18**	**Dzień 21**	**Dzień 24**	**Dzień 27**	**Dzień 30**
1P6	**4 ˚C**	347 ± 2	349 ± 3	348 ± 0	353 ± 3	349 ± 3	349 ± 1	356 ± 2	354 ± 2	355 ± 2	347 ± 2	353 ± 1
2P6		374 ± 3	379 ± 2	377 ± 1	386 ± 3	379 ± 1	378 ± 1	393 ± 6	384 ± 3	385 ± 1	377 ± 2	381 ± 2
3P6		402 ± 1	405 ± 4	404 ± 2	417 ± 2	414 ± 2	415 ± 3	430 ± 5	429 ± 3	416 ± 3	407 ± 5	426 ± 6
4P6		427 ± 2	432 ± 7	429 ± 6	448 ± 5	441 ± 3	442 ± 3	458 ± 6	460 ± 4	457 ± 1	434 ± 3	451 ± 6
IP6	**4 ˚C**	362 ± 1	364 ± 2	363 ± 2	371 ± 3	363 ± 2	365 ± 3	373 ± 1	373 ± 2	376 ± 1	371 ± 1	374 ± 1
IIP6		387 ± 3	390 ± 2	391 ± 1	401 ± 3	393 ± 3	392 ± 2	409 ± 7	407 ± 4	404 ± 2	395 ± 1	407 ± 3
IIIP6		402 ± 3	408 ± 7	417 ± 1	435 ± 9	439 ± 7	425 ± 6	432 ± 6	436 ± 3	434 ± 5	427 ± 9	442 ± 5
IVP6		435 ± 2	445 ± 9	444 ± 3	486 ± 7	469 ± 6	476 ± 5	482 ± 5	484 ± 16	457 ± 2	470 ± 8	475 ± 7



Rycina 31. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 1 % kroplach „przemysłowych" z cefuroksymem sodowym w wersjach P6, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni.



Rycina 32. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 5 % kroplach „przemysłowych" z cefuroksymem sodowym w wersjach P6, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni.

Tabela 26. Zmiana lepkości w 1 % i 5 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C.

Wersja kropli	Gęstość (g/mL)			Lepkość (mPa • s)		
	Dzień 0	Dzień 30		Dzień 0	Dzień 30	
		4 ^{0}C	20 ^{0}C		4 ^{0}C	20 ^{0}C
3R	1,0279 ± 0,0000	1,0276 ± 0,0000	1,0276 ± 0,0002	8.22 ± 0.02	8.10 ± 0.02	7.72 ± 0.02
4R	1,0274 ± 0,0002	1,0275 ± 0,0000	1,0274 ± 0,0002	8.15 ± 0.03	8.02 ± 0.01	7.76 ± 0.02
IIIR	1,0342 ± 0,0000	1,0340 ± 0,0002	1,0341 ± 0,0000	8.46 ± 0.01	8.33 ± 0.01	7.96 ± 0.01
IVR	1,0328 ± 0,0002	1,0326 ± 0,0003	1,0326 ± 0,0000	8.28 ± 0.02	8.12 ± 0.01	7.80 ± 0.02

Tabela 27. Zmiana lepkości w 1 % i 5 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych”, wykonanych na świeżo sporządzonych rozpuszczalnikach, przechowywanych w temperaturze 4°C.

Wersja kropli	Gęstość (g/mL)		Lepkość (mPa • s)	
	Dzień 0	Dzień 30 4 ^{0}C	Dzień 0	Dzień 30 4 ^{0}C
3P0	1,0278 ± 0,0001	1,0276 ± 0,0002	8,02 ± 0,03	8,00 ± 0,02
4P0	1,0271 ± 0,0003	1,0270 ± 0,0002	7,81 ± 0,01	7,74 ± 0,03
IIIP0	1,0351 ± 0,0001	1,0348 ± 0,0002	9,28 ± 0,00	9,15 ± 0,00
IVP0	1,0330 ± 0,0002	1,0330 ± 0,0001	8,92 ± 0,01	8,90 ± 0,00

Tabela 28. Zmiana lepkości w 1 % i 5 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych”, wykonanych na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej testowi przyśpieszonego starzenia (6 miesięcy, 40 ^{0}C ± 2 ^{0}C/75 RH ± 5 RH), przechowywanych w temperaturze 4 °C.

Wersja kropli	Gęstość (g/mL)		Lepkość (mPa • s)	
	Dzień 0	Dzień 30 4 ^{0}C	Dzień 0	Dzień 30 4 ^{0}C
3P6	1,0289 ± 0,0002	1,0288 ± 0,0002	8,94 ± 0,01	8,85 ± 0,01
4P6	1,0282 ± 0,0001	1,0283 ± 0,0001	8,68 ± 0,00	8,67 ± 0,16
IIIP6	1,0362 ± 0,0002	1,0364 ± 0,0002	9,69 ± 0,01	9,62 ± 0,01
IVP6	1,0334 ± 0,0002	1,0333 ± 0,0001	9,52 ± 0,00	9,48 ± 0,01

Tabela 29. Ocena organoleptyczna 1 % i 5 % (w/w) kropli do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych w dniu sporządzenia i po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20^{0}C.

Symbol wersji recepturowej	Dzień 0		Dzień 30			
			4°C		20°C	
	barwa klarowność	zapach	barwa klarowność	zapach	barwa klarowność	zapach
0$_{(1\%)}$	bezbarwne klarowne	antybiotyku	słomkowa klarowne	antybiotyku	jasnożółta klarowne	antybiotyku
1R	bezbarwne klarowne	antybiotyku	słomkowa klarowne	antybiotyku	jasnożółta klarowne	antybiotyku
2R	bezbarwne klarowne	zapach alkoholu β-fenyloetylowego	słomkowa klarowne	zapach alkoholu β-fenyloetylowego	jasnożółta klarowne	zapach alkoholu β-fenyloetylowego
3R	bezbarwne klarowne	antybiotyku	słomkowa klarowne	antybiotyku	jasnożółta klarowne	antybiotyku
4R	bezbarwne klarowne	zapach alkoholu β-fenyloetylowego	słomkowa klarowny	zapach alkoholu β-fenyloetylowego	jasnożółta klarowne	zapach alkoholu β-fenyloetylowego
0$_{(5\%)}$	słomkowa klarowne	antybiotyku	jasnożółta klarowne	antybiotyku	bursztynowa klarowne	antybiotyku
IR	słomkowa klarowne	antybiotyku	jasnożółta klarowne	antybiotyku	bursztynowa klarowne	antybiotyku
IIR	słomkowa klarowne	zapach alkoholu β-fenyloetylowego	jasnożółta klarowne	zapach alkoholu β-fenyloetylowego	bursztynowa klarowne	zapach alkoholu β-fenyloetylowego
IIIR	słomkowa klarowne	antybiotyku	jasnożółta klarowne	antybiotyku	bursztynowa klarowne	antybiotyku
IVR	słomkowa klarowne	zapach alkoholu β-fenyloetylowego	jasnożółta klarowne	zapach alkoholu β-fenyloetylowego	bursztynowa klarowne	zapach alkoholu β-fenyloetylowego

Tabela 30. Ocena organoleptyczna 1 % i 5 % (w/w) kropli do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych”, w dniu sporządzenia i po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C.

Symbol wersji przemysłowej	**Dzień 0**		**Dzień 30**	
			4°C	
	barwa klarowność	**zapach**	**barwa klarowność**	**zapach**
1P0 i 1P6	bezbarwne klarowne	antybiotyku	słomkowa klarowne	antybiotyku
2P0 i 2P6	bezbarwne klarowne	zapach alkoholu β-fenyloetylowego	słomkowa klarowne	zapach alkoholu β-fenyloetylowego
3P0 i 3P6	bezbarwne klarowne	antybiotyku	słomkowa klarowne	antybiotyku
4P0 i 4P6	bezbarwne klarowne	zapach alkoholu β-fenyloetylowego	słomkowa klarowny	zapach alkoholu β-fenyloetylowego
IP0 i IP6	słomkowa klarowne	antybiotyku	jasnożółta klarowne	antybiotyku
IIP0 i IIP6	słomkowa klarowne	zapach alkoholu β-fenyloetylowego	jasnożółta klarowne	zapach alkoholu β-fenyloetylowego
IIIP0 i IIIP6	słomkowa klarowne	antybiotyku	jasnożółta klarowne	antybiotyku
IVP0 i IVP6	słomkowa klarowne	zapach alkoholu β-fenyloetylowego	jasnożółta klarowne	zapach alkoholu β-fenyloetylowego

11. Analiza zmiany zawartości cefuroksymu sodowego w roztworach wodnych oraz kroplach w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C oraz w kroplach „przemysłowych", przechowywanych w temperaturze 4 °C w ciągu 30 dni.

11.1. Parametry pracy układu chromatograficznego.

Badanie zmiany zawartości cefuroksymu sodowego w roztworach wodnych oraz kroplach recepturowych i przemysłowych prowadzono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z wykorzystaniem elucji izokratycznej. Warunki rozdziału chromatograficznego przedstawiono w tabeli 31.

Tabela 31. Warunki rozdziału chromatograficznego.

Kolumna	C-18; 4,6 mm x 150 mm
Faza ruchoma	bufor octanowy pH 3,4: acetonitryl (10:1 w/w)
Przepływ fazy ruchomej	1,0 mL/min
Objętość nastrzyku dla 1 % kropli	10µl
Objętość nastrzyku dla 5 % kropli	5µl
Marker czasu martwego	uracyl
Długość fali UV detektora	273 nm
Temperatura	25 °C

11.2. Skład i wykonanie fazy ruchomej.

Fazę ruchomą przygotowano w oparciu o przepis z Farmakopei Polskiej VI [73], znajdujący się w monografii szczegółowej cefuroksymu sodowego. Bufor octanowy pH 3,4 wymieszano w stosunku wagowym 10:1 z acetonitrylem o czystości gradient grade, a następnie przesączono przez sączek z politetrfafluoroetylenu – Millipore o średnicy porów 0,45 µm.

Tabela 32. Skład buforu octanowego pH 3,4.

Składniki:	**Ilość**
Trójwodny octan sodu M = 136,08 g/mol	0,41 g
Kwas octowy (99 – 100 %) M = 60,05 g/mol d = 1,049 g/cm^3	3,80 mL
Woda do analiz HPLC	do 1000,00 g

Wykonanie:

Na wadze elektronicznej odważono z dokładnością do 0,001 g trójwodny octan sodu, który rozpuszczono w 500,0 g wody ultraczystej do HPLC. Następnie dodano przypisaną ilość kwasu octowego do uzyskania wymaganego pH 3,4 i uzupełniono wodą ultraczystą do 1000,0 g.

Bufor przechowywano w temperaturze 4 ^{0}C i mieszano z acetonitrylem bezpośrednio przed rozpoczęciem analizy chromatograficznej.

11.3. Metoda wzorca zewnętrznego.

W analizie zmian zawartości cefuroksymu sodowego metodą HPLC wykorzystano metodę wzorca zewnętrznego. W tym celu wykreślono krzywe wzorcowe przedstawiające zależność pola powierzchni piku od stężenia wzorca cefuroksymu sodowego (CRS) w wodzie ultraczystej. Do wykreślenia krzywej wzorcowej za każdym razem sporządzono 6 roztworów wzorcowych, obejmujących zakres stężeń od około 25 µg/mL do około 150 µg/mL, które nastrzykiwano trzykrotnie na kolumnę chromatograficzną.

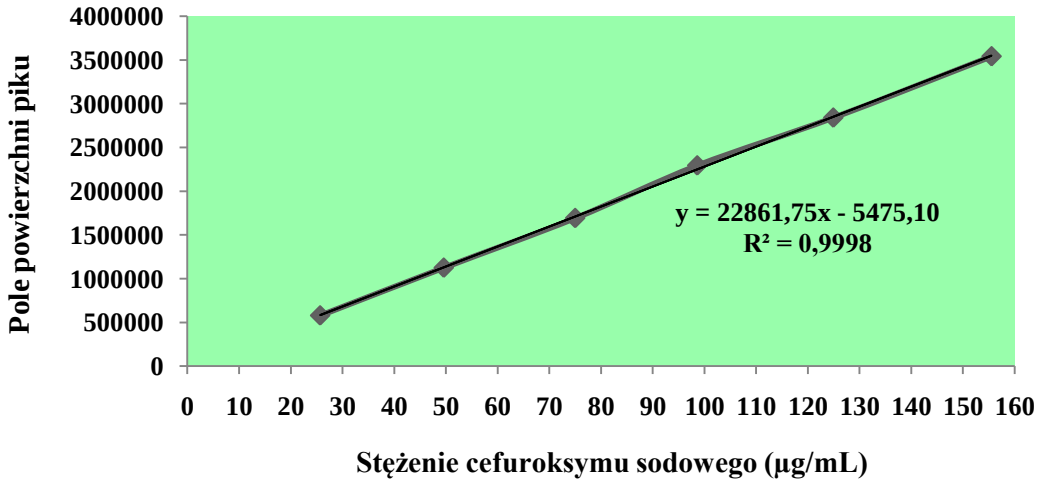
11.3.1. Roztwór wzorcowy cefuroksymu sodowego.

Na wadze analitycznej Sartorius odważono z dokładnością do 0,0001 g wzorzec cefuroksymu sodowego (CRS), który przeniesiono do kolby miarowej o obj. 100 mL. Następnie dodano uracyl (jako marker czasu martwego kolumny) i uzupełniono objętość kolby wodą ultraczystą do HPLC. Po dokładnym wymieszaniu roztwór wzorcowy przesączono przez filtr strzykawkowy Chromafil Pet 45/15 o średnicy porów 0,45 µm bezpośrednio do vialki i poddano analizie chromatograficznej według punktu 11.1.

Wyniki analizy chromatograficznej roztworów wzorcowych cefuroksymu sodowego, na podstawie których wykreślono 4 krzywe kalibracyjne (A, B, C, D), przedstawiono w tabelach 33 - 36 i na rycinach 33 -36.

Tabela 33. Zależność pola powierzchni od stężenia cefuroksymu sodowego dla krzywej kalibracyjnej A.

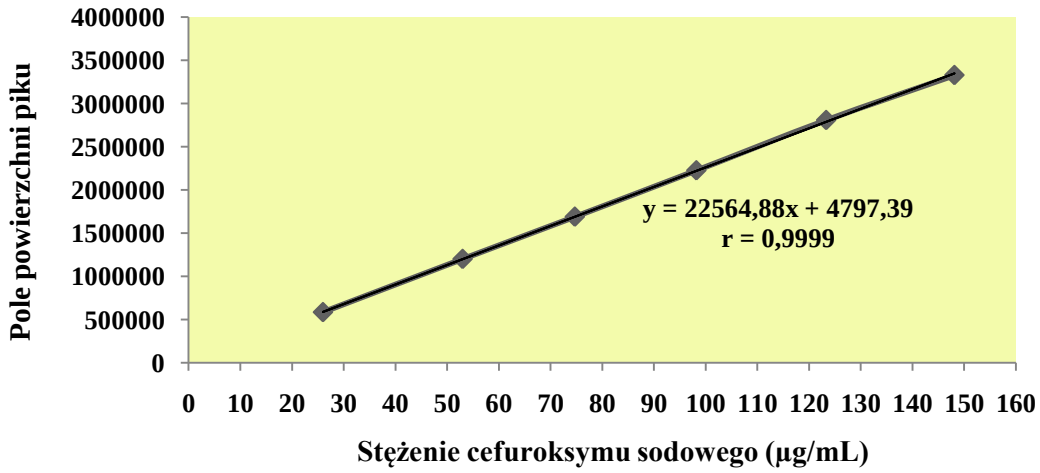
Stężenie roztworu wzorcowego cefuroksymu sodowego (µg/mL)	Pole powierzchni piku			Średnie pole powierzchni
	1	2	3	
25,7	579242	578601	579214	579019
49,6	1123865	1126110	1123973	1124649
75,0	1690534	1695588	1689593	1691905
98,6	2294515	2295511	2288917	2292981
124,9	2841361	2837499	2838611	2839157
155,5	3539999	3541779	3538717	3540165



Rycina 33. Krzywa kalibracyjna A

Tabela 34. Zależność pola powierzchni od stężenia cefuroksymu sodowego dla krzywej kalibracyjnej B.

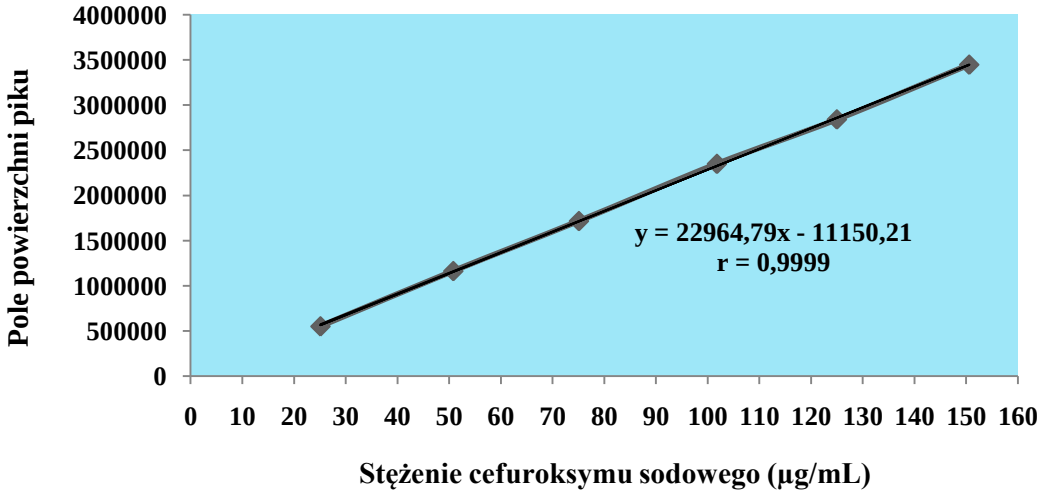
Stężenie roztworu wzorcowego cefuroksymu sodowego (µg/mL)	Pole powierzchni piku			Średnie pole powierzchni
	1	2	3	
26,0	585294	584920	587103	585772
53,0	1199417	1201112	1201802	1200777
74,7	1688730	1690143	1689456	1689443
98,2	2224666	2225473	2227151	2225763
123,3	2806735	2807756	2808253	2807581
148,1	3327462	3327936	3327559	3327652



Rycina 34. Krzywa kalibracyjna B.

Tabela 35. Zależność pola powierzchni od stężenia cefuroksymu sodowego dla krzywej kalibracyjnej C.

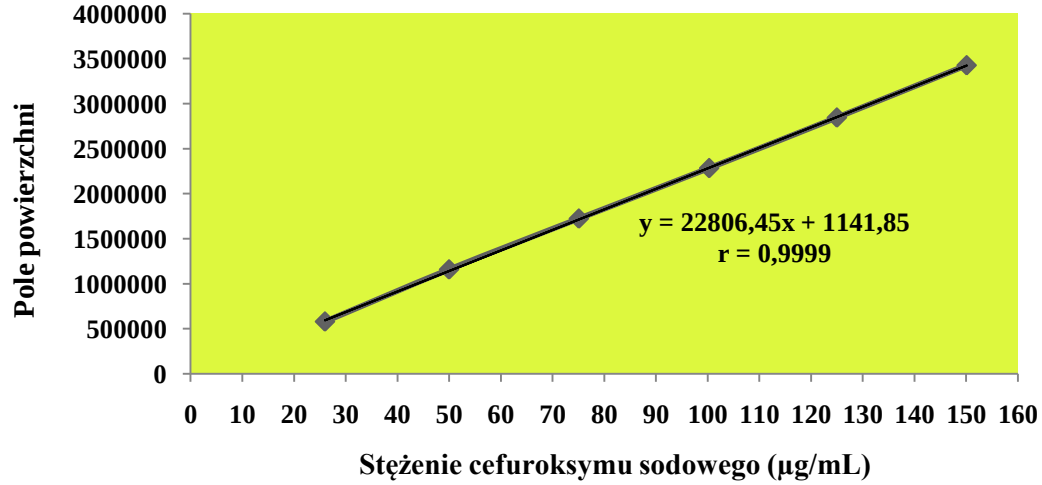
Stężenie roztworu wzorcowego cefuroksymu sodowego (µg/mL)	Pole powierzchni piku			Średnie pole powierzchni
	1	2	3	
25,1	552778	553090	550711	552193
50,8	1162688	1162536	1165428	1163551
75,1	1714387	1717249	1717933	1716523
101,8	2348325	2349565	2349068	2348986
125,0	2837669	2842439	2841541	2840550
150,6	3444327	3447787	3445557	3445890



Rycina 35. Krzywa kalibracyjna C.

Tabela 36. Zależność pola powierzchni od stężenia cefuroksymu sodowego dla krzywej kalibracyjnej D.

Stężenie roztworu wzorcowego cefuroksymu sodowego (µg/mL)	Pole powierzchni piku			Średnie pole powierzchni
	1	2	3	
26,0	577615	579018	579949	578861
50,0	1157585	1157906	1157936	1157809
75,1	1723431	1722190	1722982	1722868
100,3	2282718	2284605	2283712	2283678
125,0	2846539	2845434	2843636	2845203
150,1	3424636	3427694	3425754	3426028



Rycina 36. Krzywa kalibracyjna D.

11.3.2. Analiza regresji.

W ramach analizy statystycznej danych niezbędnych do wykreślenia krzywych wzorcowych, dokonano ocenę istotności korelacji między zmiennymi i ocenę istotności regresji [76]. Wyniki przeprowadzonej analizy przedstawiono w tabelach 37 i 38.

Tabela 37. Analiza regresji krzywych wzorcowych A i B.

Parametr oceny	Krzywa wzorcowa A	Krzywa wzorcowa B
Współczynnik korelacji r	**r** = 0,9998 > $\mathbf{r_{\alpha,f}}$ = 0,8114 (α = 0,05 i f = 4), co potwierdza istotność korelacji	**r** = 0,9999 > $\mathbf{r_{\alpha,f}}$ = 0,8114 (α = 0,05 i f = 4), co potwierdza istotność korelacji
Rozrzut wartości y (S^2y)	$\mathbf{S^2_y}$ = 621796750,49	$\mathbf{S^2_y}$ = 210571653,34
Sy	$\mathbf{S_y}$ = 24935,85	$\mathbf{S_y}$ = 14511,09
Współczynnik regresji a	**a** = 22861,75	**a** = 22564,88
Błąd standardowy współczynnika regresji a	**Sa** = 231,98	**Sa** = 143,65
Przedział ufności współczynnika regresji a $\mathbf{a \pm t_{\alpha,f} \bullet Sa}$ **(α = 0,05 i f = 4)**	22861,75 ± 643,98	22564,88 ± 398,77
Istotność współczynnika regresji a $\mathbf{t = a/Sa}$	t = 98,55 > $\mathbf{t_{\alpha,f}}$ = 2,776 (α = 0,05 i f = 4) a ≠ 0, co potwierdza istotność regresji	t = 157,08 > $\mathbf{t_{\alpha,f}}$ = 2,776 (α = 0,05 i f = 4) a ≠ 0, co potwierdza istotność regresji
Współczynnik regresji b	**b** = - 5475,10	**b** = 4797,39
Błąd standardowy współczynnika regresji b	**Sb** = 22856,39	**Sb** = 13858,72
Przedział ufności współczynnika regresji b $\mathbf{b \pm t_{\alpha,f} \bullet Sb}$ **(α = 0,05 i f = 4)**	- 5475,10 ± 63449,34	4797,39 ± 38471,81
Istotność współczynnika regresji b $\mathbf{t = b/Sb}$	t = - 0,24 < $\mathbf{t_{\alpha,f}}$ = 2,776 (α = 0,05 i f = 4) b = 0, co potwierdza nieistotność współczynnika regresji b	t = 0,35 < $\mathbf{t_{\alpha,f}}$ = 2,776 (α = 0,05 i f = 4) b = 0, co potwierdza nieistotność współczynnika regresji b
Postać równania regresji	**y = 22861,75x**	**y = 22564,88x**

Tabela 38. Analiza regresji krzywych wzorcowych C i D.

Parametr oceny	Krzywa wzorcowa C	Krzywa wzorcowa D
Współczynnik korelacji r	**r** = 0,9999 > $\mathbf{r_{\alpha,f}}$ = 0,8114 (α = 0,05 i f = 4), co potwierdza istotność korelacji	**r** = 0,9999 > $\mathbf{r_{\alpha,f}}$ = 0,8114 (α = 0,05 i f = 4), co potwierdza istotność korelacji
Rozrzut wartości y (S^2y)	$\mathbf{S^2_y}$ = 275735483,25	$\mathbf{S^2_y}$ =163167377,72
Sy	$\mathbf{S_y}$ = 16605,28	$\mathbf{S_y}$ = 12773,70
Współczynnik regresji a	**a** = 22964,79	**a** = 22806,45
Błąd standardowy współczynnika regresji a	**Sa** = 158,43	**Sa** = 122,74
Przedział ufności współczynnika regresji a $\mathbf{a \pm t_{\alpha,f} \bullet Sa}$ **(α = 0,05 i f = 4)**	22964,79 ± 439,81	22806,45 ± 340,73
Istotność współczynnika regresji a **t =a/Sa**	t = 144,95 > $\mathbf{t_{\alpha,f}}$ = 2,776 (α = 0,05 i f = 4) a ≠ 0, co potwierdza istotność regresji	t = 185,81 > $\mathbf{t_{\alpha,f}}$ = 2,776 (α = 0,05 i f = 4) a ≠ 0, co potwierdza istotność regresji
Współczynnik regresji b	**b** = -11150,21	**b** = 1141,85
Błąd standardowy współczynnika regresji b	**Sb** = 15512,46	**Sb** = 11966,52
Przedział ufności współczynnika regresji b $\mathbf{b \pm t_{\alpha,f} \bullet Sb}$ **(α = 0,05 i f = 4)**	-11150,21 ± 43062,58	1141,85 ± 33219,07
Istotność współczynnika regresji b **t =b/Sb**	t = -0,72 < $\mathbf{t_{\alpha,f}}$ = 2,776 (α = 0,05 i f = 4) b = 0, co potwierdza nieistotność współczynnika regresji b	t = 0,10 < $\mathbf{t_{\alpha,f}}$ = 2,776 (α = 0,05 i f = 4) b = 0, co potwierdza nieistotność współczynnika regresji b
Postać równania regresji	**y = 22964,79x**	**y = 22806,45x**

11.4. Walidacja metody oznaczania cefuroksymu sodowego.

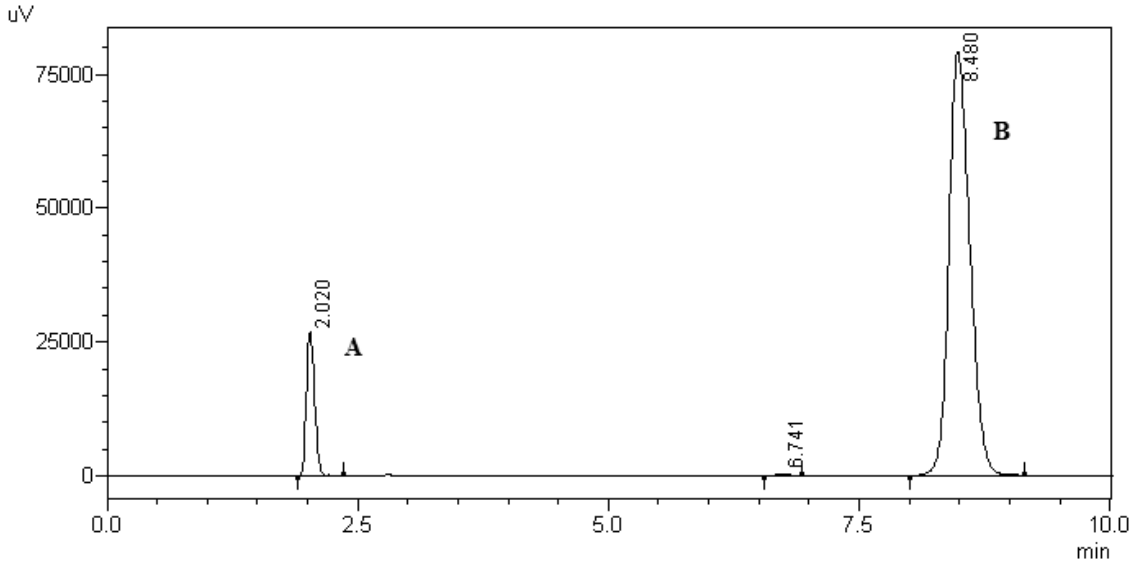
W ramach walidacji metody ilościowego oznaczania cefuroksymu sodowego metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) wyznaczono następujące parametry: specyficzność, dokładność, precyzja, wykrywalność, oznaczalność, liniowość i robustness [76,77].

11.4.1. Specyficzność.

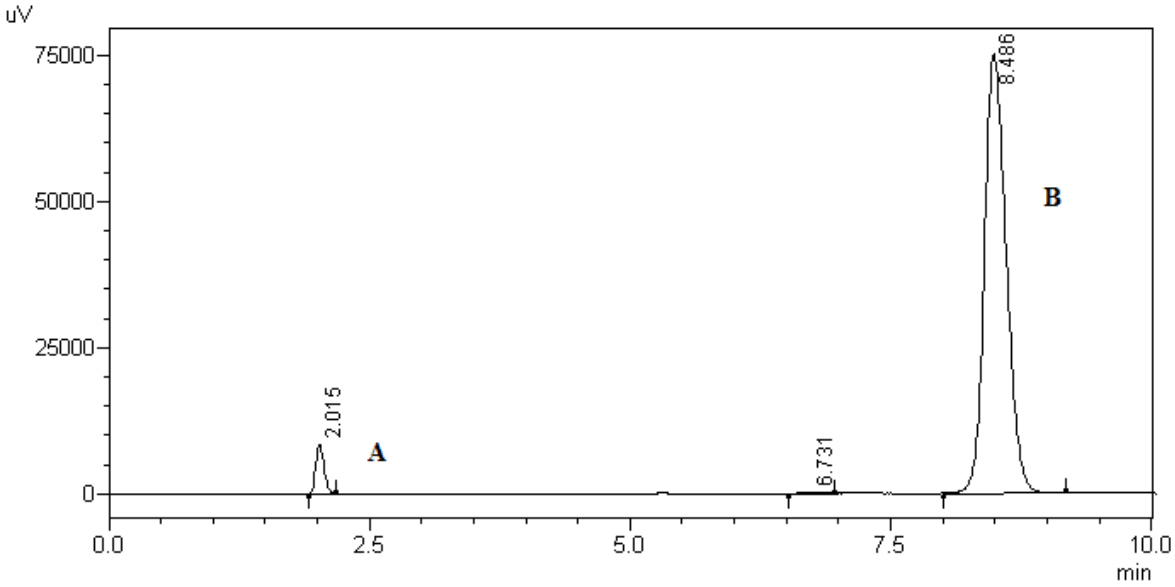
W celu wykazania, że opracowana metoda ilościowego oznaczania cefuroksymu sodowego w badanej matrycy jest specyficzna, poddano analizie chromatograficznej według punktu 11.1. natępujące roztwory:

- roztwór wodny preparatu Biofuroksym (cefuroksym sodowy)
- wzorzec cefuroksymu sodowego (CRS) wg Farmakopei Europejskiej 6.0
- matrycę, którą stanowił roztwór wszystkich substancji pomocniczych włączonych do receptury kropli w najwyższym stężeniu, odpowiadającym składowi jakościowemu i ilościowemu wersji nr 4 1 % kropli do oczu.

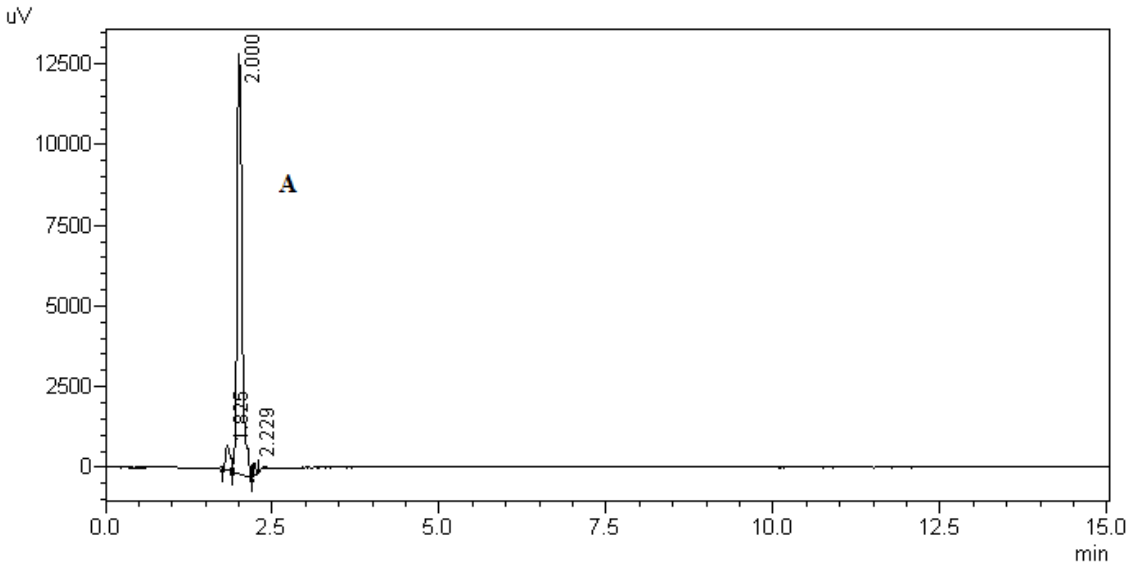
Wyniki badań przedstawiono w postaci chromatogramów na rycinach 37 - 39. Dodatkowo na rycinie 40 przedstawiono widmo UV w zakresie od 200 nm do 400 nm dla cefuroksymu sodowego, natomiast na rycinie 41 widmo UV w zakresie od 200 nm do 400 nm dla roztworu substancji pomocniczych o składzie jakościowym i ilościowym odpowiadającym wersji nr 4 1 % kropli.



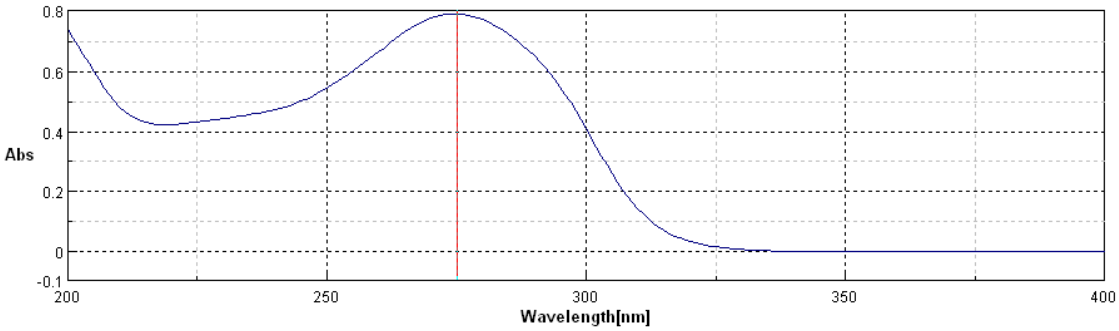
Rycina 37. Chromatogram roztworu wodnego preparatu Biofuroksym (cefuroksym sodowy), A – pik uracylu, B – pik cefuroksymu



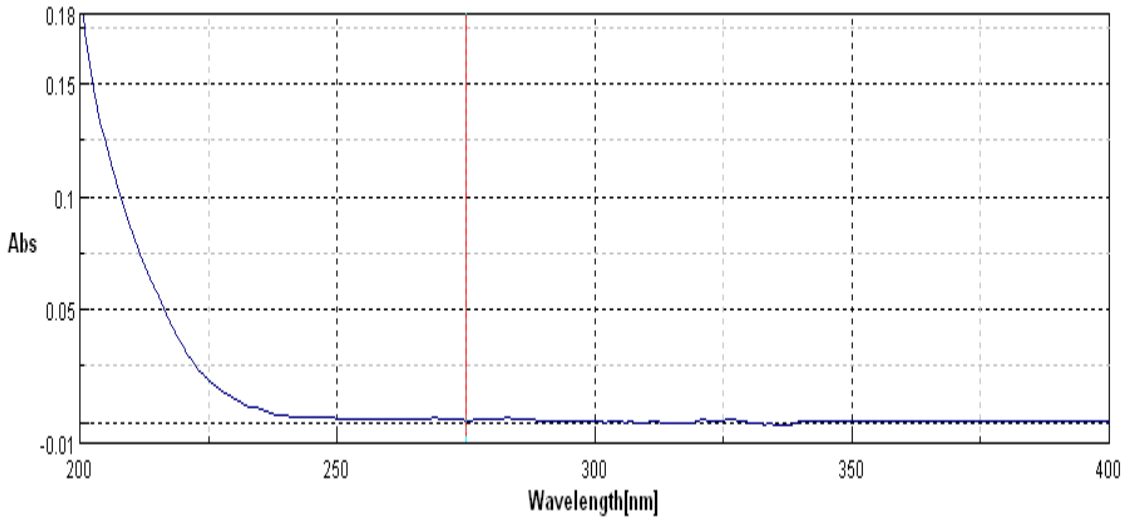
Rycina 38. Chromatogram roztworu wodnego wzorca cefuroksymu sodowego (CRS), A-pik uracylu, B- pik cefuroksymu



Rycina 39. Chromatogram roztworu wszystkich substancji pomocniczych włączonych do składu kropli, o składzie jakościowym i ilościowym odpowiadającym wersji nr 4 1 % kropli, A – pik uracylu.



Rycina 40. Widmo UV cefuroksymu sodowego w zakresie długości fali 200 nm – 400 nm. Analityczna długość fali λ_{max} = 273 nm.



Rycina 41. Widmo UV roztworu wszystkich substancji pomocniczych włączonych do składu kropli, o składzie jakościowym i ilościowym odpowiadającym wersji nr 4 kropli 1 %.

11.4.2. Dokładność.

Dokładność metody ilościowego oznaczania cefuroksymu sodowego w 1 % i 5 % kroplach określono na podstawie analizy chromatograficznej mieszanin modelowych kropli, które zawierały odpowiednio 50 %, 75 %, 100 % i 125 % cefuroksymu sodowego w odniesieniu do zawartości antybiotyku w badanych kroplach. Mieszaniny modelowe dla 1 % kropli (a, b, c, d) wykonano na rozpuszczalniku, który składem jakościowym i ilościowym substancji pomocniczych odpowiadał wersji kropli nr 4, natomiast mieszaniny modelowe dla 5 % kropli (e, f, g, h) wykonano na rozpuszczalniku odpowiadającym wersji kropli nr IV. Każdą mieszaninę modelową sporządzono w dwóch seriach, następnie do każdej serii przygotowano po 3 próbki do nastrzyku według punktu 11.5.3. Analizę chromatograficzną prowadzono zgodnie z warunkami przedstawionymi w punkcie. 11.1. Za miarę dokładności metody przyjęto procent odzysku cefuroksymu sodowego, który obliczono ze wzoru:

$$\text{Odzysk (\%)} = \frac{\text{stężenie oznaczone}}{\text{stężenie obliczone}} \times 100\%$$

Stężenie cefuroksymu sodowego określone na podstawie pól powierzchni pików obliczono według punktu 11.5.5. Do obliczeń wykorzystano krzywą kalibracyjną A. Wyniki dokładności przedstawiono w tabelach 39 – 42.

Tabela 39. Wyniki oznaczeń cefuroksymu sodowego w mieszaninach modelowych a i b.

Mieszanina modelowa	n	Stężenie mieszaniny modelowej cefuroksymu sodowego (mg/g)	Gęstość mieszaniny modelowej (g/mL)	Stężenie cefuroksymu sodowego w mieszaninie modelowej (mg/mL)	Pole powierzchni piku	Stężenie cefuroksymu sodowego obliczone na podstawie pola powierzchni piku (mg/mL)	Odzysk (%)
a1 (50 %)	**1**	5,023	1,0256 ± 0,0001	5,151	1171848	5,126	99,51
	2				1158377	5,067	98,36
	3				1162613	5,085	98,72
	Średnia				**1164279**	**5,039**	**98,86**
	SD				**6888**	**0,030**	**0,58**
	Wz (%)				**0,59**	**0,59**	**0,59**
a2 (50 %)	**1**	5,001	1,0255 ± 0,0001	5,129	1165398	5,098	99,39
	2				1160555	5,076	98,98
	3				1156959	5,061	98,67
	Średnia				**1160971**	**5,078**	**99,02**
	SD				**4235**	**0,019**	**0,36**
	Wz (%)				**0,36**	**0,36**	**0,36**
b1 (75%)	**1**	7,468	1,0266 ± 0,0002	7,667	1726713	7,553	98,51
	2				1743173	7,625	99,45
	3				1735280	7,590	99,00
	Średnia				**1735055**	**7,589**	**98,99**
	SD				**8232**	**0,036**	**0,47**
	Wz (%)				**0,47**	**0,47**	**0,47**
b2 (75%)	**1**	7,447	1,0265 ± 0,0001	7,644	1722478	7,534	98,56
	2				1740315	7,612	99,58
	3				1735595	7,592	99,31
	Średnia				**1732796**	**7,579**	**99,15**
	SD				**9242**	**0,040**	**0,53**
	Wz (%)				**0,53**	**0,53**	**0,53**

Tabela 40. Wyniki oznaczeń cefuroksymu sodowego w mieszaninach modelowych c i d.

Mieszanina modelowa	n	Stężenie mieszaniny modelowej cefuroksymu sodowego (mg/g)	Gęstość mieszaniny modelowej (g/mL)	Stężenie cefuroksymu sodowego w mieszaninie modelowej (mg/mL)	Pole powierzchni piku	Stężenie cefuroksymu sodowego obliczone na podstawie pola powierzchni piku (mg/mL)	Odzysk (%)
c1 (100 %)	**1**	10,011	1,0271 ± 0,0001	10,283	2307642	10,094	98,16
	2				2308693	10,098	98,21
	3				2314431	10,124	98,45
	Średnia				**2310255**	**10,105**	**98,27**
	SD				**3654**	**0,016**	**0,16**
	Wz (%)				**0,16**	**0,16**	**0,16**
c2 (100 %)	**1**	9,920	1,0271 ± 0,0001	10,188	2288795	10,011	98,26
	2				2281786	9,981	97,96
	3				2278055	9,964	97,80
	Średnia				**2282879**	**9,986**	**98,01**
	SD				**5453**	**0,024**	**0,23**
	Wz (%)				**0,24**	**0,24**	**0,24**
d1 (125%)	**1**	12,464	1,0276 ± 0,0001	12,808	2854090	12,484	97,47
	2				2869080	12,550	97,99
	3				2881674	12,605	98,42
	Średnia				**2868281**	**12,546**	**97,96**
	SD				**13809**	**0,060**	**0,47**
	Wz (%)				**0,48**	**0,48**	**0,48**
d2 (125%)	**1**	12,505	1,0276 ± 0,0001	12,850	2874332	12,573	97,84
	2				2894816	12,662	98,54
	3				2877810	12,588	97,96
	Średnia				**2882319**	**12,608**	**98,12**
	SD				**10961**	**0,048**	**0,37**
	Wz (%)				**0,38**	**0,38**	**0,38**

Tabela 41. Wyniki oznaczeń cefuroksymu sodowego w mieszaninach modelowych e i f.

Mieszanina modelowa	n	Stężenie mieszaniny modelowej cefuroksymu sodowego (mg/g)	Gęstość mieszaniny modelowej (g/mL)	Stężenie cefuroksymu sodowego w mieszaninie modelowej (mg/mL)	Pole powierzchni piku	Stężenie cefuroksymu sodowego obliczone na podstawie pola powierzchni piku (mg/mL)	Odzysk (%)
e1 (50 %)	**1**	24,997	1,0241 ± 0,0001	25,600	1167694	25,538	99,76
	2				1170952	25,609	100,04
	3				1153940	25,237	98,58
	Średnia				**1164195**	**25,462**	**99,46**
	SD				**9030**	**0,197**	**0,77**
	Wz (%)				**0,78**	**0,78**	**0,78**
e2 (50 %)	**1**	25,016	1,0242 ± 0,0000	25,621	1165865	25,498	99,52
	2				1155836	25,279	98,66
	3				1164401	25,466	99,40
	Średnia				**1162034**	**25,414**	**99,19**
	SD				**5417**	**0,118**	**0,46**
	Wz (%)				**0,47**	**0,47**	**0,47**
f1 (75%)	**1**	37,507	1,0289 ± 0,0002	38,591	1750690	38,289	99,22
	2				1763400	38,567	99,94
	3				1748743	38,246	99,11
	Średnia				**1754278**	**38,367**	**99,42**
	SD				**7960**	**0,174**	**0,45**
	Wz (%)				**0,45**	**0,45**	**0,45**
f2 (75%)	**1**	37,437	1,0289 ± 0,0001	38,519	1760665	38,507	99,97
	2				1749034	38,252	99,31
	3				1751867	38,314	99,47
	Średnia				**1753855**	**38,358**	**99,58**
	SD				**6065**	**0,133**	**0,34**
	Wz (%)				**0,35**	**0,35**	**0,35**

Tabela 42. Wyniki oznaczeń cefuroksymu sodowego w mieszaninach modelowych g i h.

Mieszanina modelowa	n	Stężenie mieszaniny modelowej cefuroksymu sodowego mg/g)	Gęstość mieszaniny modelowej (g/mL)	Stężenie cefuroksymu sodowego w mieszaninie modelowej (mg/mL)	Pole powierzchni piku	Stężenie (w/v) cefuroksymu sodowego obliczone na podstawie pola powierzchni piku (mg/mL)	Odzysk (%)
g1 (100 %)	**1**	49,956	1,0336 ± 0,0002	51,635	2352096	51,442	99,63
	2				2348404	51,361	99,47
	3				2347964	51,351	99,45
	Średnia				**2349488**	**51,385**	**99,52**
	SD				**2269**	**0,050**	**0,10**
	Wz (%)				**0,10**	**0,10**	**0,10**
g2 (100 %)	**1**	49,841	1,0337 ± 0,0001	51,520	2351496	51,429	99,82
	2				2343058	51,244	99,46
	3				2355227	51,510	99,98
	Średnia				**2349927**	**51,394**	**99,76**
	SD				**6234**	**0,136**	**0,26**
	Wz (%)				**0,27**	**0,27**	**0,27**
h1 (125%)	**1**	62,226	1,0380 ± 0,0002	64,591	2911088	63,667	98,57
	2				2929222	64,064	99,18
	3				2944009	64,387	99,68
	Średnia				**2928106**	**64,039**	**99,15**
	SD				**16489**	**0,361**	**0,56**
	Wz (%)				**0,56**	**0,56**	**0,56**
h2 (125%)	**1**	62,165	1,0380 ± 0,0002	64,527	2943552	64,377	99,77
	2				2911000	63,665	98,66
	3				2911169	63,669	98,67
	Średnia				**2921907**	**63,904**	**99,03**
	SD				**18745**	**0,410**	**0,64**
	Wz (%)				**0,64**	**0,64**	**0,64**

11.4.3. Precyzja.

Precyzję metody oznaczania cefuroksymu sodowego w 1 % i 5 % kroplach do oczu określoną poprzez odchylenie standardowe (SD) i procent względnego odchylenia standardowego, zwany współczynnikiem zmienności (Wz), przedstawiono w tabelach: 39 – 42.

11.4.4. Granica wykrywalności (DL).

Granicę wykrywalności metody wyznaczono na podstawie odchylenia standardowego krzywej kalibracyjnej (S_y) i współczynnika kierunkowego krzywej kalibracyjnej (a):

$$\mathbf{DL = 3{,}3 \bullet S_y/a}$$

W tabeli 43 przedstawiono granicę wykrywalności cefuroksymu sodowego w zastosowanej metodzie analitycznej, określoną na podstawie parametrów obliczonych z czterech krzywych kalibracyjnych w przeciągu całego cyklu badań:

Tabela 43. Granica wykrywalności cefuroksymu sodowego.

Krzywa kalibracyjna	**A**	**B**	**C**	**D**
DL (µg/mL)	3,60	2,12	2,39	1,85

11.4.5. Granica oznaczalności (QL).

Granicę oznaczalności metody określono na podstawie odchylenia standardowego krzywej kalibracyjnej (S_y) i współczynnika kierunkowego krzywej kalibracyjnej (a):

$$\mathbf{DL = 10 \bullet S_y/a}$$

W tabeli 44 przedstawiono granicę oznaczalności cefuroksymu sodowego w obranej metodzie analitycznej, określoną na podstawie parametrów obliczonych z czterech krzywych kalibracyjnych w przeciągu całego cyklu badań:

Tabela 44. Granica oznaczalności cefuroksymu sodowego.

Krzywa kalibracyjna	**A**	**B**	**C**	**D**
QL (µg/mL)	10,91	6,43	7,23	5,60

11.4.6. Liniowość metody.

Liniowość metody chromatograficznego oznaczania cefuroksymu sodowego udowodniono w zakresie od 25 % do 150 % w odniesieniu do oczekiwanych wyników analizy. Wyniki analizy przedstawiono w punktach. 11.3.1. i 11.3.2.

11.4.7. Robustness.

W walidowanej metodzie chromatograficznego oznaczania cefuroksymu sodowego w roztworach wodnych oraz kroplach dokonano oceny wpływu zaplanowanych zmian na wielkość uzyskanych pól powierzchni, podczas analizy roztworów wzorcowych.

W celu zbadania elastyczności metody wprowadzono następujące zmiany:

1. Roztwór wzorcowy cefuroksymu sodowego nastrzykiwano na kolumnę wystabilizowaną w trzech temperaturach:
    - ✓ w temperaturze 20 ^{0}C
    - ✓ w temperaturze 25 ^{0}C (zgodnej z założonymi warunkami dla opracowanej metody)
    - ✓ w temperaturze 30 ^{0}C
2. Dokonano 10 % zmiany zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej przeprowadzając analizę przy:
    - ✓ 90 % zawartości acetonitrylu, w stosunku do ilości założonej w przyjętym dla metody składzie fazy ruchomej
    - ✓ 100 % (ilość zgodna z założonymi warunkami rozdziału chromatograficznego)
    - ✓ 110 % acetonitrylu w stosunku do ilości wynikającej ze składu fazy ruchomej
3. Sporządzono trzy fazy ruchome różniące się wartością pH:
    - ✓ pH 3,3
    - ✓ pH 3,4 (pH zgodne z założonymi warunkami dla opracowanej metody)
    - ✓ pH 3,5

Do oceny wpływu zaplanowanych zmian na pola powierzchni, a zarazem obliczoną zawartość cefuroksymu sodowego wykorzystano trzy roztwory wzorcowe cefuroksymu (w1,w2 i w3), każdy nastrzykując trzykrotnie na kolumnę. Wyniki badań przedstawiono w tabelach 45 - 47.

Tabela 45. Wpływ zamiany temperatury kolumny chromatograficznej na pole powierzchni i czas retencji analitu, na przykładzie analizy roztworu wodnego cefuroksymu sodowego – w1.

Temperatura	**Pole powierzchni pików**				**Średni czas retencji t_R (min)**	**Oznaczone stężenie (mg/mL)**
	P1	**P2**	**P3**	**Średnie pole powierzchni**		
20 ^{0}C	1684791	1684808	1684805	1684801	9,051	7,369
25 ^{0}C	**1687317**	**1679148**	**1687642**	**1684702**	**8,398**	**7,370**
30 ^{0}C	1685465	1684507	1684409	1684794	7,807	7,369
Średnia				**1684766**		**7,369**
SD				**55**		**0,000241**
Wz (%)				**0,003 %**		**0,003 %**

Tabela 46. Wpływ zamiany zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej na pole powierzchni i czas retencji analitu, na przykładzie analizy roztworu wodnego cefuroksymu sodowego – w2.

Acetonitryl	**Pole powierzchni pików**				**Średni czas retencji t_R (min)**	**Oznaczone stężenie (mg/mL)**
	P1	**P2**	**P3**	**Średnie pole powierzchni**		
90 %	1704363	1703291	1702304	1703319	9,859	7,451
100 %	**1707060**	**1707412**	**1701421**	**1705298**	**8,400**	**7,459**
110 %	1709018	1705496	1704273	1706262	7,419	7,463
Średnia				**1704960**		**7,458**
SD				**1500**		**0,007**
Wz (%)				**0,088 %**		**0,088 %**

Tabela 47. Wpływ zamiany pH fazy ruchomej na pole powierzchni i czas retencji analitu, na przykładzie analizy roztworu wodnego cefuroksymu sodowego – w3.

pH	Pole powierzchni pików				Średni czas retencji t_R (min)	Oznaczone stężenie (mg/mL)
	P1	P2	P3	Średnie pole powierzchni		
3,3	1701530	1699228	1700233	1700330	8,668	7,437
3,4	**1704502**	**1703285**	**1700679**	**1702822**	**8,413**	**7,448**
3,5	1703620	1696679	1697985	1699428	8,421	7,433
Średnia				**1700860**		**7,440**
SD				**1758**		**0,008**
Wz (%)				**0,103 %**		**0,103 %**

11.5. Analiza zmiany zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % i 5 % (w/w) roztworach wodnych i kroplach do oczu, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C.

11.5.1.Materiał do badań.

Analizę zmiany zawartości cefuroksymu sodowego metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) przeprowadzono w 1 % i 5 % (w/w) roztworach wodnych antybiotyku oraz w recepturowych i przemysłowych wersjach kropli do oczu, które wykonano według punktów 8.3. i 9.2., zgodnie z składem przytoczonym w tabelach 15 i 17.

11.5.2. Czas badań.

Badania każdej serii roztworów i kropli z antybiotykiem prowadzono w odstępach trzydniowych, w ciągu 30 dni. Materiał do badań przechowywano w chłodziarkach farmaceutycznych MED. – 28 w temperaturze 4 ^{0}C, a w przypadku roztworów wodnych cefuroksymu sodowego i kropli w wersji recepturowej dodatkowo w celach porównawczych zastosowano temperaturę przechowywania 20 ^{0}C.

11.5.3. Przygotowanie prób do analizy zmiany zawartości cefuroksymu sodowego w badanym materiale.

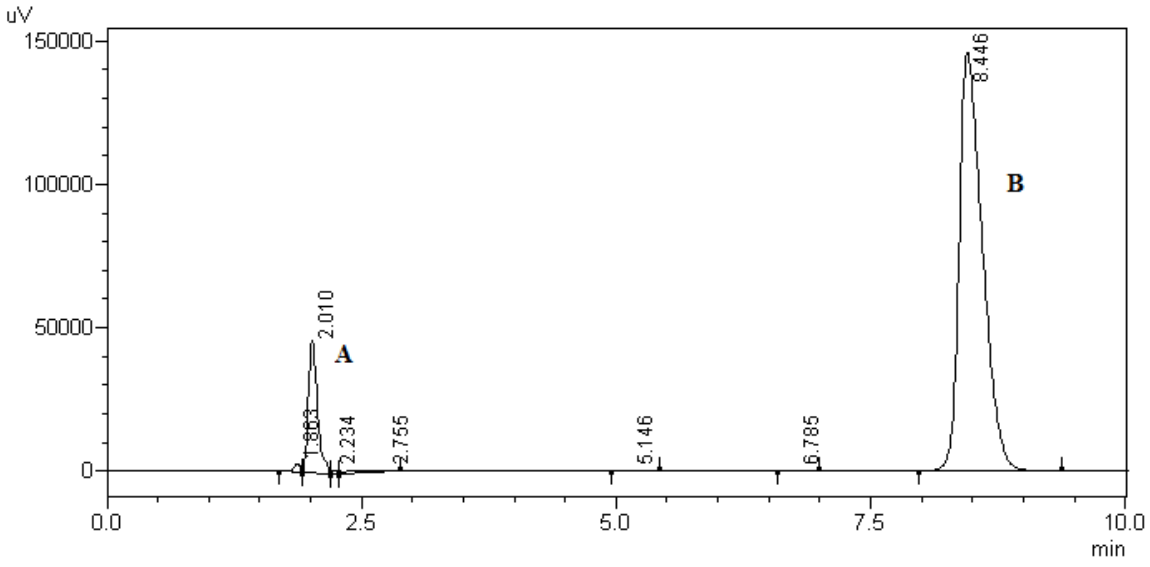
Do oddzielnych 3 kolb miarowych o pojemności 25 mL pobierano przy pomocy pipet półautomatycznych po 250 µL 1 % kropli lub 100 µL 5 % kropli. Do każdej kolby dodawano uracyl, który zastosowano jako marker w celu wyznaczenia czasu martwego kolumny t_0 i obliczenia współczynnika retencji k dla pików cefuroksymu. Objętość kolb uzupełniano wodą do HPLC i mieszano. Roztwory sączono przez sączek membranowy Chromafil 0,45 µm do vialek, które następnie umieszczono w autosamplerze. Rozdział chromatograficzny prowadzono według warunków przytoczonych w punkcie 11.1. Z każdej z trzech vialek wykonano po jednym nastrzyku, otrzymując po trzy wyniki dotyczące każdej analizowanej serii kropli. Na podstawie zarejestrowanych pól powierzchni pików obliczono, z równania krzywej kalibracyjnej, stężenie cefuroksymu w analizowanych próbach.

11.5.4. Parametry rozdziału chromatograficznego.

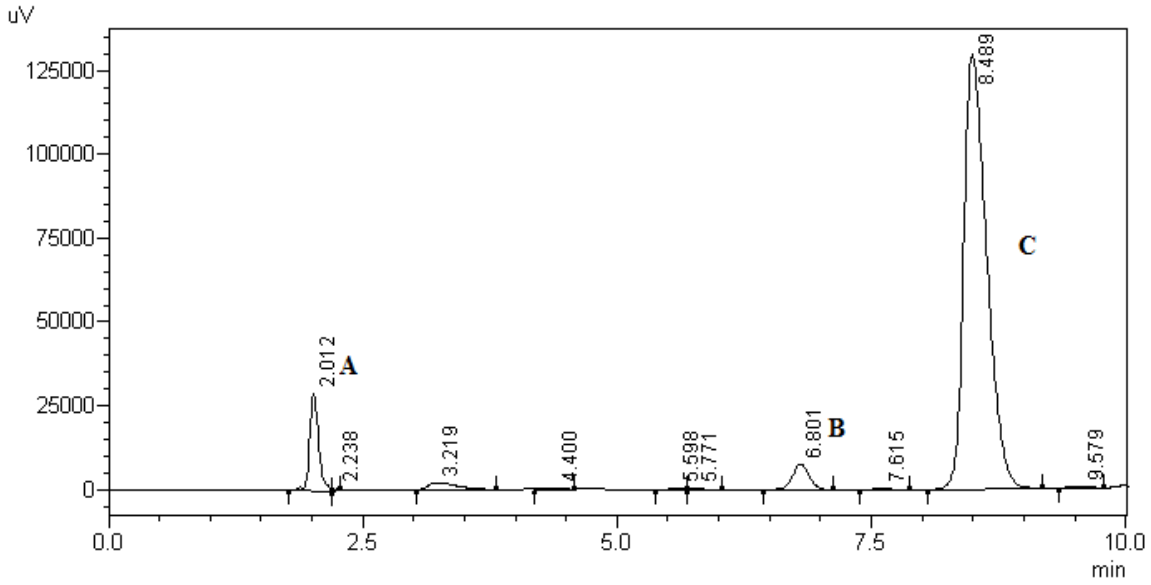
W trakcie analizy zmian zawartości cefuroksymu sodowego w badanych kroplach wyznaczono następujące parametry rozdziału chromatograficznego [78]:

- ✓ **t_R** – czas retencji
- ✓ **Area** – pole powierzchni piku
- ✓ **Height** – wysokość piku
- ✓ **N** – ilość półek teoretycznych na metr
- ✓ **k** – współczynnik retencji
- ✓ **$TF_{5\%}$ -** współczynnik ogonowania
- ✓ **R_s -** rozdzielczość

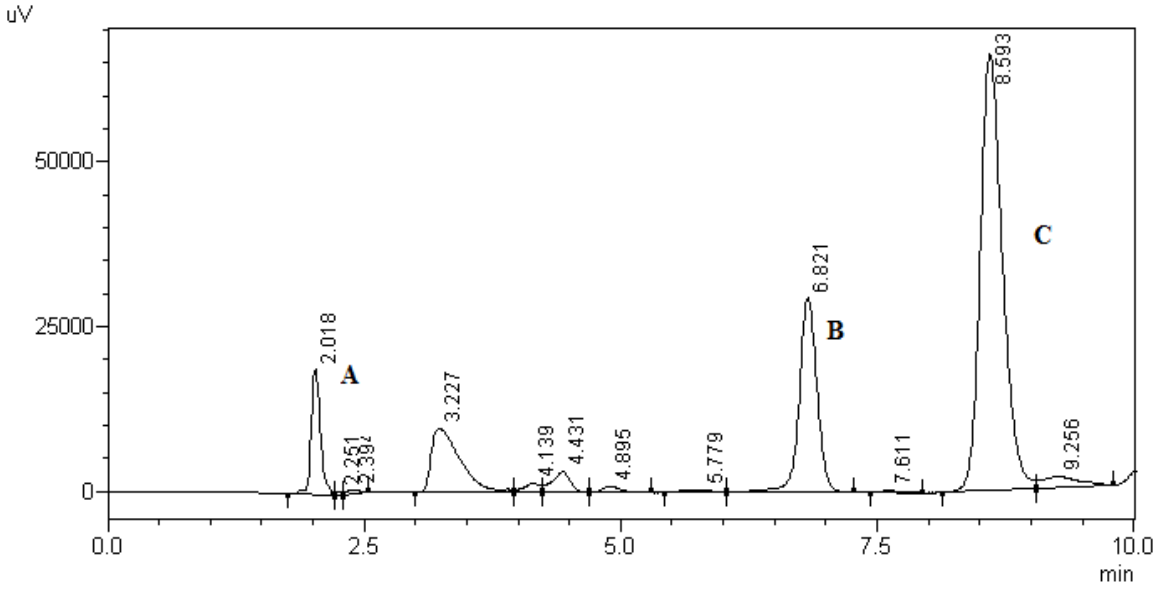
Przykładowe chromatogramy 1 % i 5% kropli recepturowych i przemysłowych w wersji nr 4 oraz nr IV w dniu sporządzenia kropli oraz w 30 dniu przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C (tylko wersje recepturowe) przedstawiono na rycinach 42 – 55. Obliczone parametry chromatograficzne zestawiono w tabeli 48.



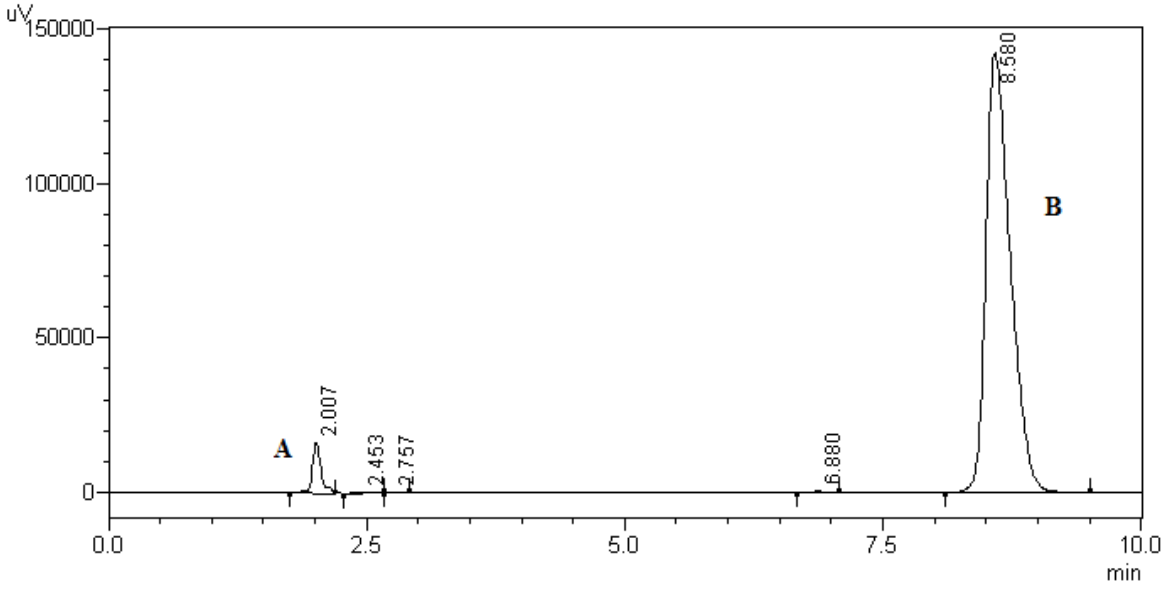
Rycina 42. Chromatogram świeżo sporządzonych 1 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji recepturowej 4R. A - pik uracylu, B - pik cefuroksymu.



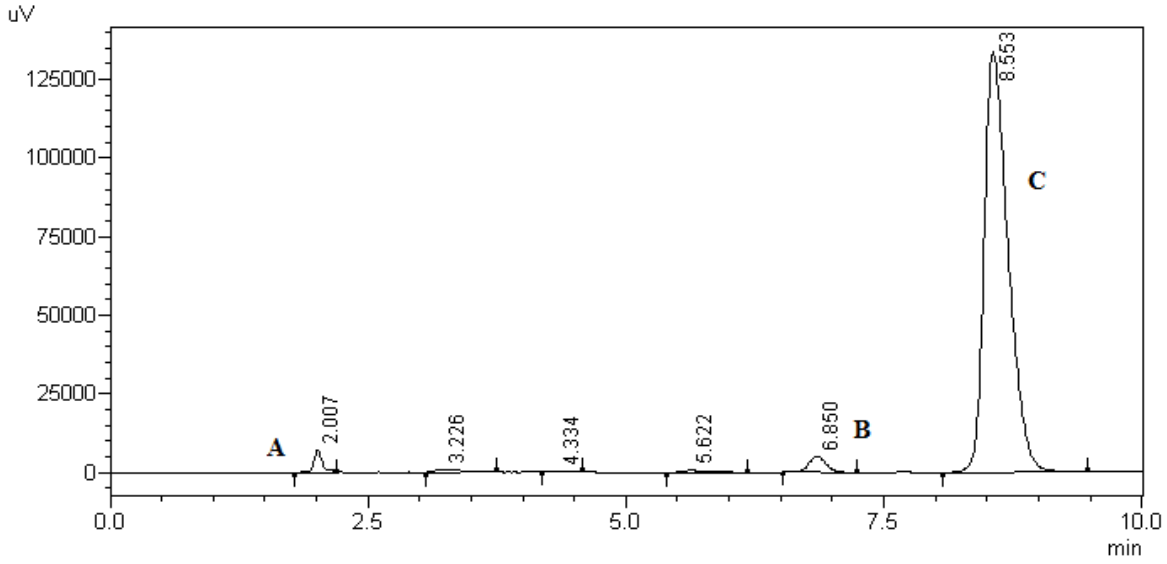
Rycina 43. Chromatogram 1 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji recepturowej 4R, przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C, dzień 30. A - pik uracylu, B - pik głównego produktu rozkładu cefuroksymu, C - pik cefuroksymu.



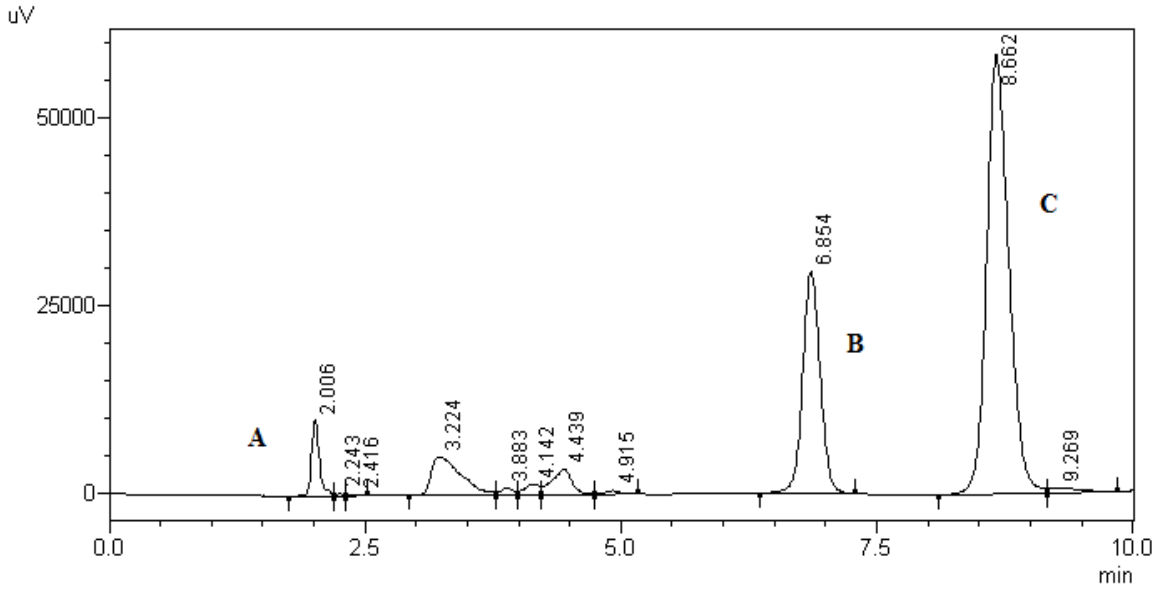
Rycina 44. Chromatogram 1 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji recepturowej 4R, przechowywanych w temperaturze 20 ^{0}C, dzień 30. A - pik uracylu, B - pik głównego produktu rozkładu cefuroksymu, C - pik cefuroksymu.



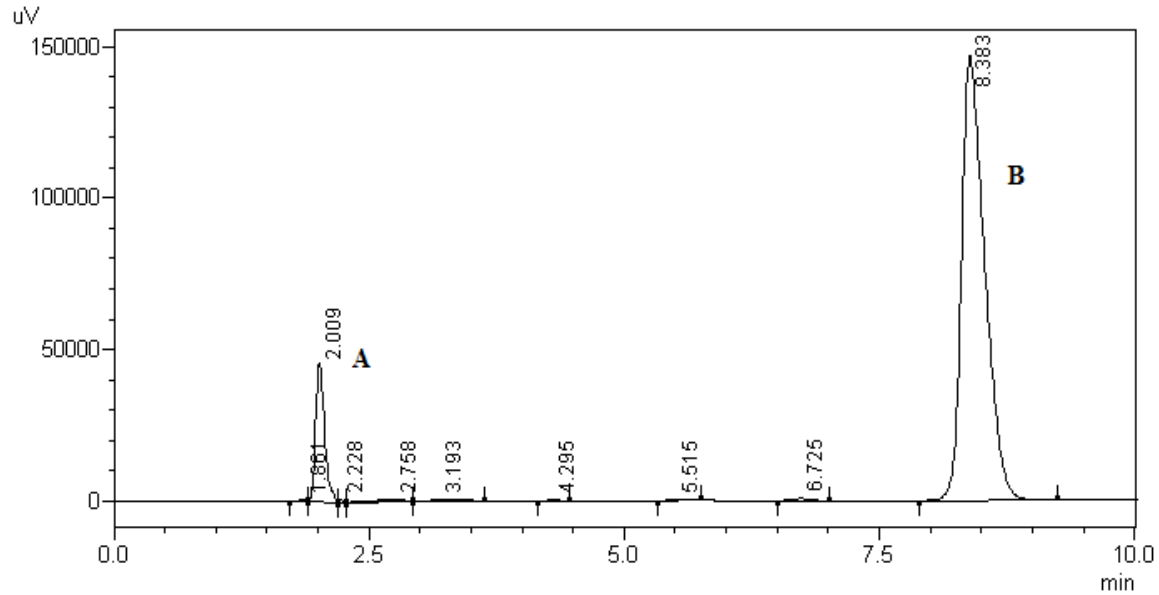
Rycina 45. Chromatogram świeżo sporządzonych 5 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji recepturowej IVR. A - pik uracylu, B - pik cefuroksymu.



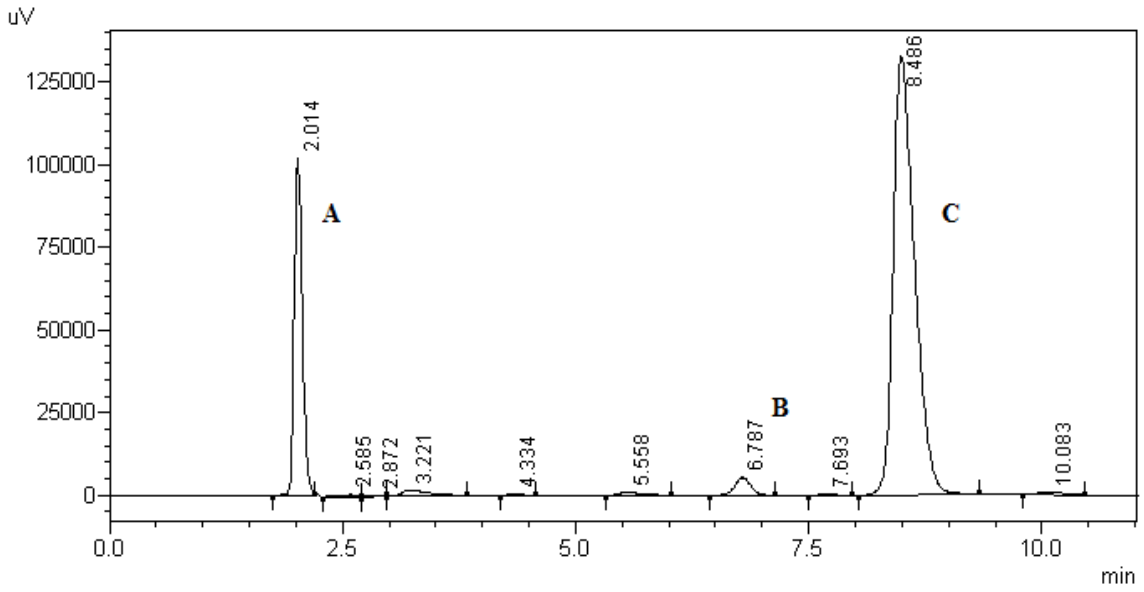
Rycina 46. Chromatogram 5 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji recepturowej IVR, przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C, dzień 30. A - pik uracylu, B - pik głównego produktu rozkładu cefuroksymu, C - pik cefuroksymu.



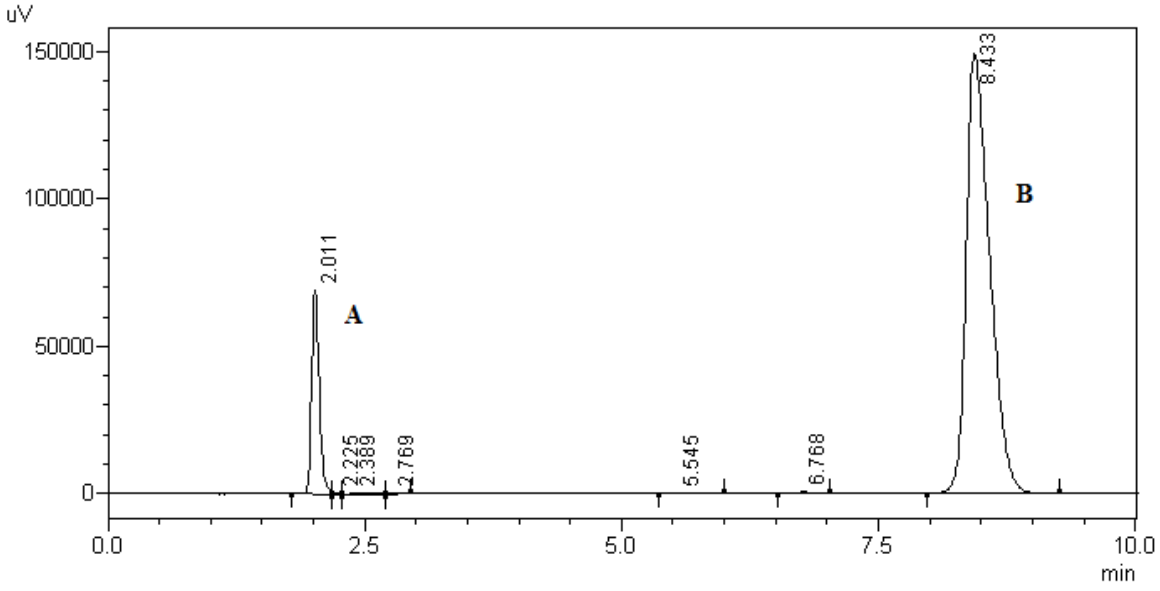
Rycina 47. Chromatogram 5 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji recepturowej IVR, przechowywanych w temperaturze 20 ^{0}C, dzień 30. A - pik uracylu, B - pik głównego produktu rozkładu cefuroksymu, C - pik cefuroksymu.



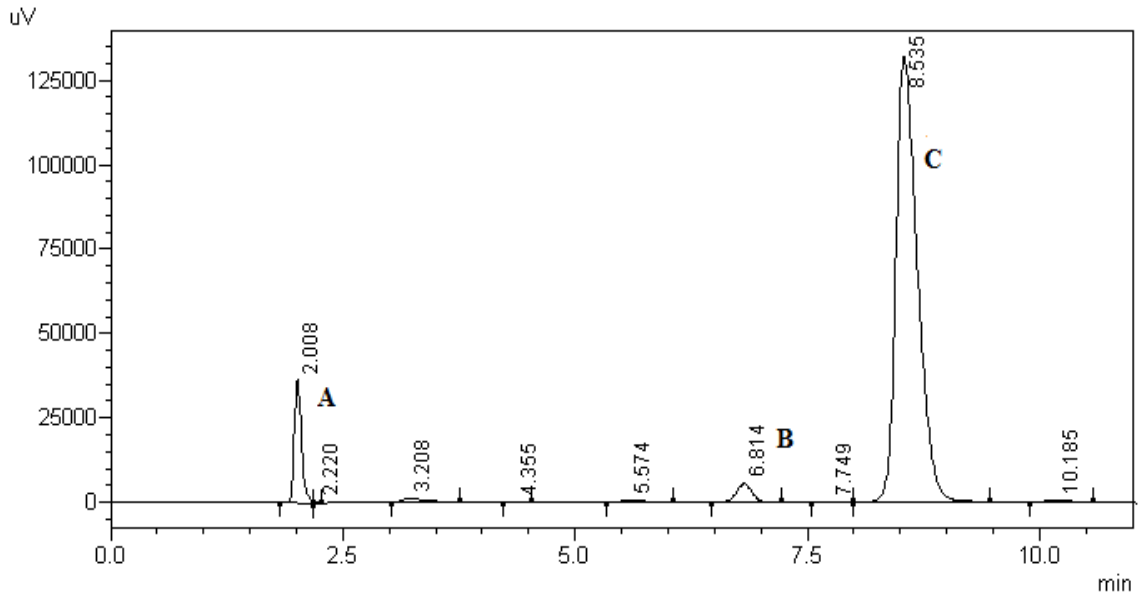
Rycina 48. Chromatogram świeżo sporządzonych 1 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji „przemysłowej” 4P0. A - pik uracylu, B - pik cefuroksymu.



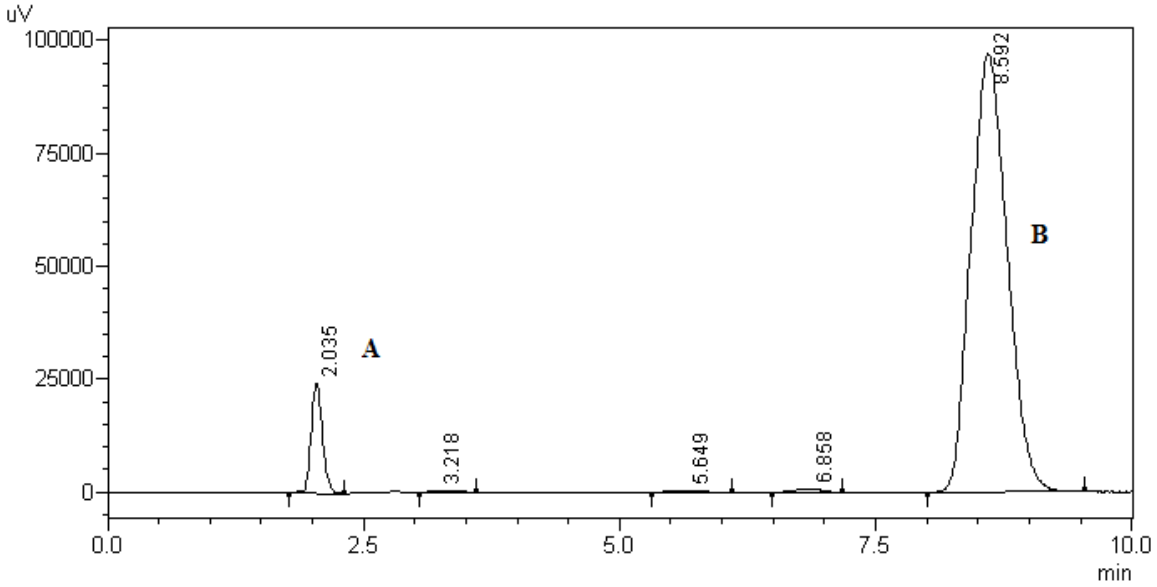
Rycina 49. Chromatogram 1 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji „przemysłowej" 4P0, przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C, dzień 30. A - pik uracylu, B - pik głównego produktu rozpadu cefuroksymu, C - pik cefuroksymu.



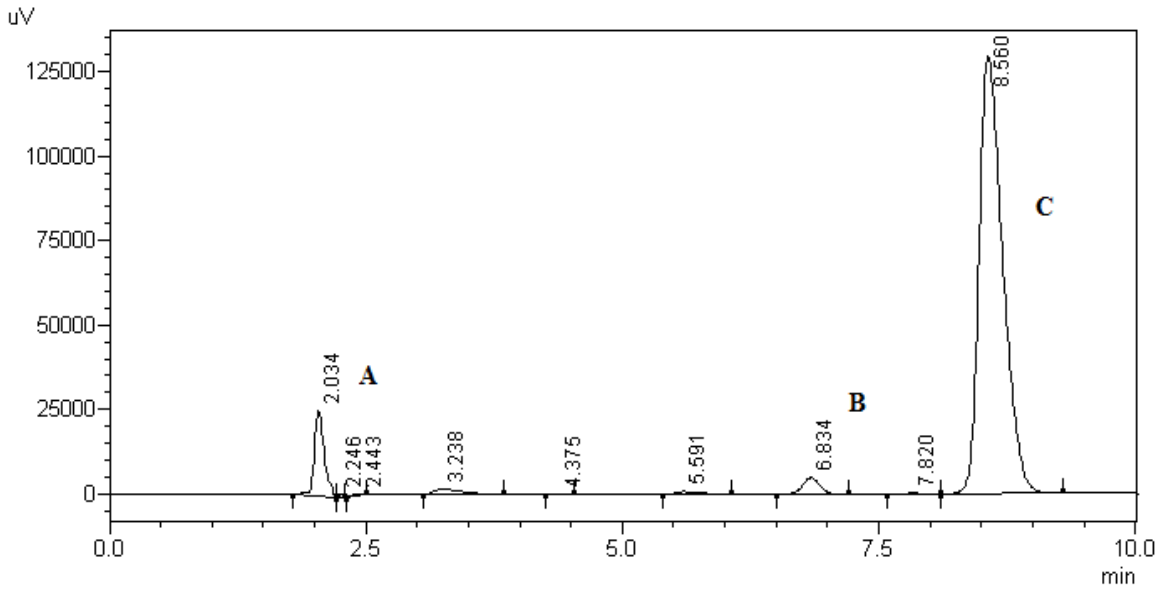
Rycina 50. Chromatogram świeżo sporządzonych 5 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji „przemysłowej" IVP0. A - pik uracylu, B - pik cefuroksymu.



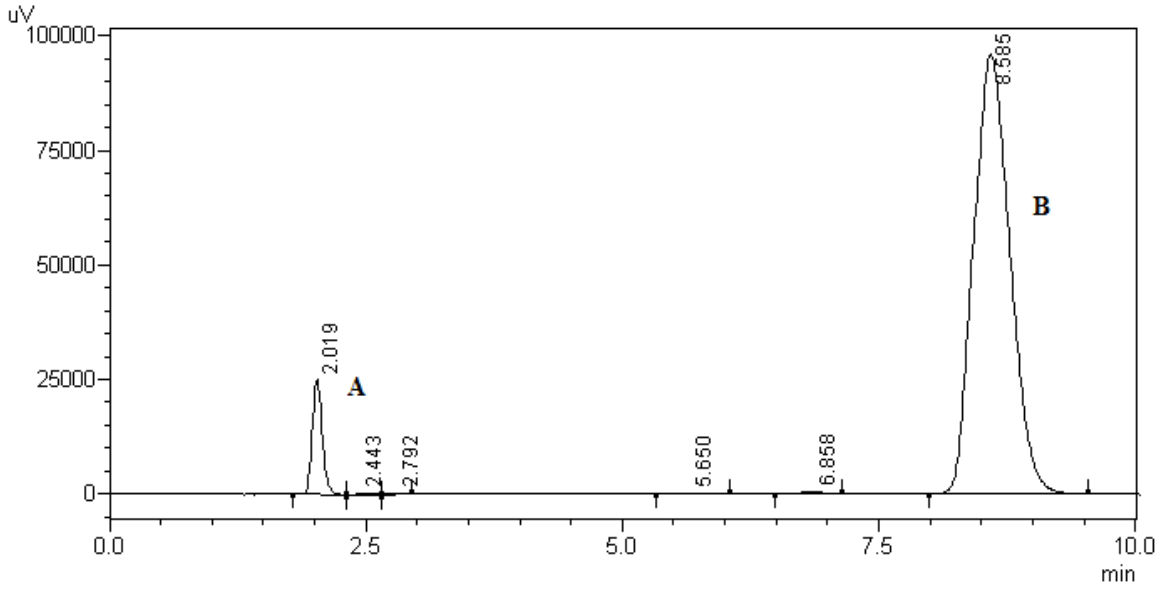
Rycina 51. Chromatogram 5 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji „przemysłowej" IVP0, przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C, dzień 30. A - pik uracylu, B - pik głównego produktu rozpadu cefuroksymu, C - pik cefuroksymu.



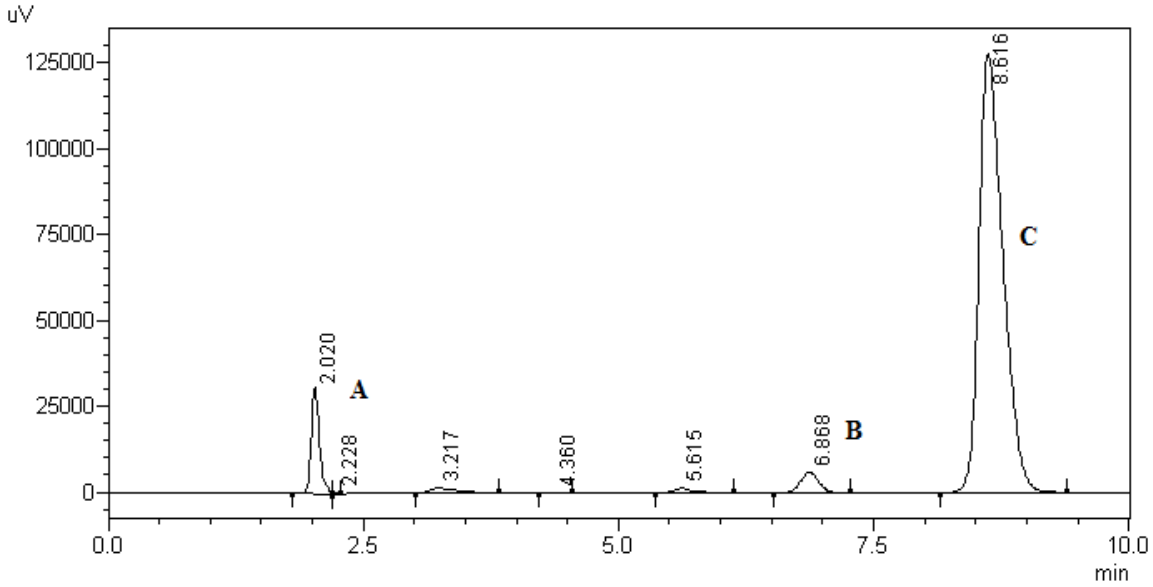
Rycina 52. Chromatogram świeżo sporządzonych 1 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji „przemysłowej" 4P6. A - pik uracylu, B - pik cefuroksymu.



Rycina 53. Chromatogram 1 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji „przemysłowej" 4P6, przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C, dzień 30. A - pik uracylu, B - pik głównego produktu rozpadu cefuroksymu, C - pik cefuroksymu.



Rycina 54. Chromatogram świeżo sporządzonych 5 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji „przemysłowej" IVP6. A - pik uracylu, B - pik cefuroksymu.



Rycina 55. Chromatogram 5 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji „przemysłowej" IVP6, przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C, dzień 30. A - pik uracylu, B - pik głównego produktu rozpadu cefuroksymu, C - pik cefuroksymu.

Tabela 48. Przykładowe parametry rozdziału chromatograficznego wyznaczone dla cefuroksymu sodowego w 1 % i 5 % (w/w) kroplach świeżo sporządzonych, jak i w 30 dniu przechowywania dla wersji nr 4 i IV.

Nr ryciny	Czas retencji (t_R)	Współczynnik retencji (k)	Pole powierzchni piku cefuroksymu	Wysokość piku cefuroksymu	Półki teoretyczne na metr (N)	Rozdzielczość (R_s)	Współczynnik ogonowania ($TF_{5\%}$)
Rycina 42	8,446	3,202	2327873	145933	40281,954	4,525	1,541
Rycina 43	8,489	3,219	2025499	129716	42591,875	2,115	1,475
Rycina 44	8,593	3,258	1001631	66330	48594,371	2,554	1,291
Rycina 45	8,580	3,275	2327788	142287	39577,046	4,443	1,516
Rycina 46	8,553	3,262	2151024	133785	41175,063	4,560	1,512
Rycina 47	8,662	3,318	884881	58355	49440,799	5,024	1,221
Rycina 48	8,383	3,173	2332578	147077	50853,667	4,487	1,520
Rycina 49	8,486	3,212	2113549	132578	41113,780	1,999	1,486
Rycina 50	8,433	3,193	2373940	149227	40508,343	4,481	1,522
Rycina 51	8,535	3,251	2123016	131991	48004,472	1,959	1,469
Rycina 52	8,592	3,223	2390066	97146	16370,237	2,891	1,181
Rycina 53	8,560	3,208	2078092	129660	41146,997	1,795	1,480
Rycina 54	8,585	3,252	2372770	96116	16181,343	2,870	1,183
Rycina 55	8,616	3,264	2085981	127681	40221,375	4,503	1,467

11.5.5. Zawartość cefuroksymu sodowego w badanym materiale.

Stężenie cefuroksymu sodowego (µg/mL), w badanych kroplach i roztworach, wyznaczono w oparciu o wzory będące przekształceniem równania regresji z uwzględnieniem współczynnika rozcieńczenia i objętości nastrzyku dla badanych prób.

a) $\mathbf{x} = \frac{250 \times y \times 2}{a}$ dla 5 % kropli i roztworów z cefuroksymem sodowym (µg/mL)

b) $\mathbf{x} = \frac{100 \times y}{a}$ dla 1 % kropli i roztworów z cefuroksymem sodowym (µg/mL)

gdzie:

- **x** – stężenie (µg/mL) cefuroksymu sodowego w badanych kroplach i roztworach.
- **y** – uśrednione pole powierzchni piku z 3 nastrzyków.
- **a** – współczynnik kierunkowy prostej obliczony dla krzywej wzorcowej.
- **250** – współczynnik rozcieńczenia dla 5 % kropli z cefuroksymem sodowym.
- **100** - współczynnik rozcieńczenia dla 1 % kropli z cefuroksymem sodowym.
- **2 –** współczynnik uwzględniający różnicę w objętości nastrzyku między 1 % kroplami a 5 % kroplami z cefuroksymem sodowym.

Do obliczenia stężenia cefuroksymu sodowego w 1 % i 5 % roztworach wodnych antybiotyku i kroplach recepturowych oraz kroplach przemysłowych wykorzystano cztery krzywe wzorcowe (A, B, C, D), których tok wykonania i analizę statystyczną przedstawiono w punkcie 11.3. Każda krzywa wzorcowa została sporządzona w momencie rozpoczęcia nowego etapu badań. Do obliczeń zawartości cefuroksymu sodowego w kroplach recepturowych o niemodyfikowanej lepkości w wersjach: 1R i 2R oraz IR i II R wykorzystano krzywą kalibracyjną A. Do wersji kropli recepturowych o modyfikowanej lepkości: 3R i 4R oraz IIIR i IVR posłużono się krzywą kalibracją B. Stężenie antybiotyku w wszystkich wersjach kropli sporządzonych na świeżo wykonanym rozpuszczalniku „przemysłowym” obliczono na podstawie równania regresji wyznaczonego z krzywej wzorcowej C. Do obliczeń stężenia antybiotyku w kroplach sporządzonych na rozpuszczalniku poddanym wcześniej

testowi przyśpieszonego starzenia przez okres 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 ^{0}C ± 2 ^{0}C/75RH ± 5RH wykorzystano krzywą wzorcową D.

Analizę zmiany zwartości cefuroksymu sodowego w roztworach wodnych oraz w kroplach w wersjach recepturowych i przemysłowych wykonywano w 3-dniowych odstępach czasu, za pomocą metody HPLC. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią z dwóch niezależnie wykonanych serii kropli, dla których wykonywano za każdym razem po 3 nastrzyki. W tabelach zestawiono, dla każdego dnia badań: średnie pole powierzchni piku, średnie stężenie antybiotyku (mg/mL), zmianę zawartości cefuroksymu sodowego oraz odchylenie standardowe pojedynczego wyniku dla n = 6.

W tabelach 49 – 58 oraz na rycinach 56 – 59 zestawiono wyniki badań dla roztworów wodnych oraz kropli recepturowych z cefuroksymem sodowym.

W tabelach 59 – 62 oraz na rycinach 60 i 61 przedstawiono wyniki badań dla kropli w wersjach „przemysłowych", wykonanych na świeżo sporządzonych rozpuszczalnikach.

W tabelach 63 – 66 oraz na rycinach 63 i 64 przedstawiono wyniki badań dla kropli w wersjach „przemysłowych", wykonanych na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej procesowi przyśpieszonego starzenia, w komorach klimatycznych przez okres 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 °C ± 2ºC, przy wilgotności 75 % RH ± 5% RH.

Tabela 49. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % roztworach wodnych, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C przez 30 dni.

1 % roztwór wodny cefuroksymu sodowego – wersja $0_{1\ \%}$ – temperatura przechowywania 4 °C i 20 °C								
	Dzień	**Średnie pole powierzchni ± SD**	**Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)**	**Zmiana zawartości antybiotyku ± SD**		**Dzień**	**Średnie pole powierzchni ± SD**	**Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)**	**Zmiana zawartości antybiotyku ± SD**
Temperatura 4 °C	0	2283350 ± 8174	9,988 ± 0,036	100 %	**Temperatura 20 °C**	0	2283350 ± 8174	9,988 ± 0,036	100 %
	3	2224196 ± 10970	9,729 ± 0,048	97,41 % ± 0,41 %		3	1981306 ± 31461	8,666 ± 0,138	86,77 % ± 1,15 %
	6	2199552 ± 13842	9,621 ± 0,061	96,33 % ± 0,36 %		6	1761657 ± 61438	7,706 ± 0,269	77,16 % ± 2,90 %
	9	2191367 ± 5874	9,585 ± 0,026	95,97 % ± 0,46 %		9	1617234 ± 12840	7,074 ± 0,056	70,83 % ± 0,44 %
	12	2160276 ± 7789	9,449 ± 0,034	94,61 % ± 0,49 %		12	1449379 ± 9900	6,340 ± 0,043	63,48 % ± 0,56 %
	15	2163364 ± 13320	9,463 ± 0,058	94,75 % ± 0,70 %		15	1324429 ± 21990	5,793 ± 0,096	58,01 % ± 1,07 %
	18	2138829 ± 6416	9,355 ± 0,028	93,67 % ± 0,33 %		18	1183601 ± 10207	5,177 ± 0,045	51,84 % ± 0,59 %
	21	2115683 ± 8389	9,254 ± 0,037	92,66 % ± 0,52 %		21	1066455 ± 6140	4,665 ± 0,027	46,71 % ± 0,36 %
	24	2110073 ± 9245	9,230 ± 0,040	92,41 % ± 0,34 %		24	938630 ± 15335	4,106 ± 0,067	41,11 % ± 0,56 %
	27	2073342 ± 32374	9,069 ± 0,142	90,80 % ± 1,55 %		27	851871 ± 9406	3,726 ± 0,041	37,31 % ± 0,47 %
	30	2039974 ± 20291	8,923 ± 0,089	89,34 % ± 1,09 %		30	758321 ± 7608	3,317 ± 0,033	33,21 % ± 0,40 %

Tabela 50. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach recepturowych w wersji 1R, przechowywanych w temperaturze 4 ºC i 20 ºC przez 30 dni.

1 % krople do oczu z cefuroksymem – wersja 1R – temperatura przechowywania 4 ºC i 20 ºC								
	Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD		Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD
Temperatura 4 ºC	0	2381135 ± 11802	10,415 ± 0,052	100 %	Temperatura 20 ºC	0	2381135 ± 11802	10,415 ± 0,052	100 %
	3	2272320 ± 17958	9,939 ± 0,079	95,43 % ± 0,54 %		3	2083168 ± 13302	9,112 ± 0,058	87,49 % ± 0,22 %
	6	2261996 ± 16440	9,894 ± 0,072	95,00 % ± 0,85 %		6	1903686 ± 15429	8,327 ± 0,067	79,95 % ± 0,46 %
	9	2223837 ± 25836	9,727 ± 0,113	93,39 % ± 0,77 %		9	1718735 ± 7482	7,518 ± 0,033	72,18 % ± 0,19 %
	12	2197502 ± 18287	9,612 ± 0,080	92,29 % ± 0,73 %		12	1536379 ± 5855	6,720 ± 0,026	64,52 % ± 0,14 %
	15	2193053 ± 25163	9,593 ± 0,110	92,10 % ± 0,73 %		15	1412174 ± 15082	6,177 ± 0,066	59,31 % ± 0,40 %
	18	2132341 ± 20310	9,327 ± 0,089	89,55 % ± 0,70 %		18	1285131 ± 6192	5,621 ± 0,027	53,97 % ± 0,07 %
	21	2106003 ± 17479	9,212 ± 0,076	88,44 % ± 0,44 %		21	1169503 ± 8929	5,116 ± 0,039	49,12 % ± 0,26 %
	24	2095996 ± 17203	9,168 ± 0,075	88,02 % ± 0,39 %		24	1058454 ± 3131	4,630 ± 0,014	44,45 % ± 0,14 %
	27	2074920 ± 5088	9,076 ± 0,022	87,14 % ± 0,40 %		27	973617 ± 7705	4,259 ± 0,034	40,89 % ± 0,17 %
	30	2056560 ± 24030	8,996 ± 0,105	86,37 % ± 0,66 %		30	866191 ± 7128	3,789 ± 0,031	36,38 % ± 0,15 %

Tabela 51. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach recepturowych w wersji 2R, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C przez 30 dni.

1 % krople do oczu z cefuroksymem – wersja 2R – temperatura przechowywania 4 °C i 20 °C								
	Dzień	**Średnie pole powierzchni ± SD**	**Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)**	**Zmiana zawartości antybiotyku ± SD**	**Dzień**	**Średnie pole powierzchni ± SD**	**Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)**	**Zmiana zawartości antybiotyku ± SD**
Temperatura 4 °C	0	2401399 ± 31507	10,504 ± 0,138	100 %	0	2401399 ± 31507	10,504 ± 0,138	100 %
	3	2304851 ± 35989	10,082 ± 0,157	95,98 % ± 0,31 %	3	2124450 ± 26159	9,293 ± 0,114	88,47 % ± 0,10 %
	6	2287019 ± 37716	10,004 ± 0,165	95,23 % ± 0,36 %	6	1925478 ± 23194	8,442 ± 0,101	80,18 % ± 0,13 %
	9	2207833 ± 14877	9,657 ± 0,065	91,95 % ± 1,25 %	9	1656416 ± 24426	7,245 ± 0,107	68,98 % ± 0,45 %
	12	2234787 ± 52113	9,775 ± 0,228	93,05 % ± 0,99 %	12	1561592 ± 30013	6,831 ± 0,131	65,02 % ± 0,42 %
	15	2211558 ± 51451	9,674 ± 0,225	92,08 % ± 0,96 %	15	1410048 ± 20133	6,168 ± 0,088	58,72 % ± 0,12 %
	18	2152205 ± 57986	9,414 ± 0,254	89,61 % ± 1,28 %	18	1265672 ± 21724	5,536 ± 0,095	52,70 % ± 0,39 %
	21	2123878 ± 51077	9,290 ± 0,223	88,43 % ± 0,99 %	21	1141333 ± 10690	4,992 ± 0,047	47,53 % ± 0,23 %
	24	2118717 ± 47225	9,268 ± 0,207	88,22 % ± 0,84 %	24	1050968 ± 15411	4,597 ± 0,067	43,76 % ± 0,22 %
	27	2072495 ± 49360	9,065 ± 0,216	86,29 % ± 1,03 %	27	948770 ± 13369	4,150 ± 0,058	39,51 % ± 0,15 %
	30	2045935 ± 39498	8,949 ± 0,173	85,19 % ± 0,64 %	30	880667 ± 16817	3,852 ± 0,074	36,67 % ± 0,29 %
								Temperatura 20 °C

Tabela 52. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach recepturowych w wersji 3R, przechowywanych w temperaturze 4 ºC i 20 ºC przez 30 dni.

1 % krople do oczu z cefuroksymem – wersja 3R – temperatura przechowywania 4 ºC i 20 ºC								
	Dzień	**Średnie pole powierzchni ± SD**	**Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)**	**Zmiana zawartości antybiotyku ± SD**	**Dzień**	**Średnie pole powierzchni ± SD**	**Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)**	**Zmiana zawartości antybiotyku ± SD**
Temperatura 4 ºC	0	2398571 ± 28601	10,630 ± 0,127	100 %	0	2398571 ± 28601	10,630 ± 0,127	100 %
	3	2344594 ± 29988	10,390 ± 0,133	97,75 % ± 1,13 %	3	2194986 ± 12593	9,727 ± 0,056	91,51 % ± 0,38 %
	6	2358391 ± 30137	10,452 ± 0,134	98,32 % ± 1,14 %	6	2004981 ± 23314	8,885 ± 0,103	83,59 % ± 1.03 %
	9	2308148 ± 11846	10,229 ± 0,052	96,23 % ± 0,59 %	9	1796693 ± 9700	7,962 ± 0,043	74,91 % ± 0,48 %
	12	2295396 ± 21088	10,172 ± 0,093	95,70 % ± 0,79 %	12	1655425 ± 13262	7,336 ± 0,059	69,02 % ± 0,49 %
	15	2262434 ± 22379	10,026 ± 0,099	94,32 % ± 0,89 %	15	1468671 ± 23002	6,509 ± 0,102	61,23 % ± 0,98 %
	18	2243111 ± 16117	9,941 ± 0,071	93,52 % ± 0,54 %	18	1366884 ± 4413	6,058 ± 0,020	56,99 % ± 0,23 %
	21	2107836 ± 34808	9,341 ± 0,154	87,88 % ± 1,36 %	21	1336727 ± 11840	5,924 ± 0,052	55,73 % ± 0,42 %
	24	2068472 ± 32823	9,167 ± 0,145	86,24 % ± 1,23 %	24	1228215 ± 11972	5,443 ± 0,053	51,21 % ± 0,45 %
	27	2049306 ± 29175	9,082 ± 0,129	85,44 % ± 1,11 %	27	1103752 ± 5700	4,891 ± 0,025	46,02 % ± 0,16 %
	30	2047953 ± 24277	9,076 ± 0,108	85,38 % ± 0,93 %	30	1013206 ± 12898	4,490 ± 0,057	42,24 % ± 0,48 %

Tabela 53. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach recepturowych w wersji 4R, przechowywanych w temperaturze 4 ºC i 20 ºC przez 30 dni.

1 % krople do oczu z cefuroksymem – wersja 4R – temperatura przechowywania 4 ºC i 20 ºC								
	Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD		Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD
Temperatura 4 ºC	0	2316812 ± 20468	10,267 ± 0,091	100 %	Temperatura 20 ºC	0	2316812 ± 20468	10,267 ± 0,091	100 %
	3	2294806 ± 10056	10,170 ± 0,045	99,05 % ± 0,72 %		3	2144066 ± 27634	9,502 ± 0,122	92,54 % ± 0,86 %
	6	2295202 ± 21909	10,172 ± 0,097	99,07 % ± 0,73 %		6	1908871 ± 24222	8,459 ± 0,107	82,39 % ± 0,73 %
	9	2217267 ± 25786	9,826 ± 0,114	95,71 % ± 1,15 %		9	1735193 ± 29655	7,690 ± 0,131	74,89 % ± 0,89 %
	12	2236158 ± 27880	9,910 ± 0,124	96,52 % ± 0,87 %		12	1605417 ± 11096	7,115 ± 0,049	69,30 % ± 0,73 %
	15	2212738 ± 21110	9,806 ± 0,094	95,51 % ± 0,45 %		15	1487968 ± 26993	6,594 ± 0,120	64,23 % ± 1,29 %
	18	2195267 ± 28319	9,729 ± 0,125	94,75 % ± 0,65 %		18	1326194 ± 18194	5,877 ± 0,081	57,24 % ± 0,69 %
	21	2068849 ± 26463	9,168 ± 0,117	89,30 % ± 0,69 %		21	1305236 ± 17045	5,784 ± 0,076	56,34 % ± 0,60 %
	24	2048141 ± 46148	9,077 ± 0,205	88,40 % ± 1,53 %		24	1202900 ± 14526	5,331 ± 0,064	51,92 % ± 0,47 %
	27	2016597 ± 26944	8,937 ± 0,119	87,04 % ± 0,67 %		27	1089578 ± 8460	4,829 ± 0,037	47,03 % ± 0,15 %
	30	2006812 ± 26262	8,894 ± 0,116	86,62 % ± 0,88 %		30	994551 ± 8181	4,408 ± 0,036	42,93 % ± 0,12 %

Tabela 54. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % roztworach wodnych, przechowywanych w temperaturze 4 ºC i 20 ºC przez 30 dni.

5 % roztwór wodny cefuroksymu sodowego – wersja $0_{5\ \%}$ – temperatura przechowywania 4 ºC i 20 ºC								
	Dzień	**Średnie pole powierzchni ± SD**	**Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)**	**Zmiana zawartości antybiotyku ± SD**	**Dzień**	**Średnie pole powierzchni ± SD**	**Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)**	**Zmiana zawartości antybiotyku ± SD**
Temperatura 4 ºC	0	2284545 ± 35936	49,964 ± 0,786	100 %	0	2284545 ± 35936	49,964 ± 0,786	100 %
	3	2244906 ± 25333	49,097 ± 0,554	98,28 % ± 1,72 %	3	2056714 ± 17155	44,982 ± 0,375	90,03 % ± 0,88 %
	6	2203123 ± 10533	48,184 ± 0,230	96,44 % ± 0,68 %	6	1792744 ± 7950	39,208 ± 0,174	78,48 % ± 1,09 %
	9	2170945 ± 7333	47,480 ± 0,160	95,04 % ± 1,07 %	9	1601922 ± 15417	35,035 ± 0,337	70,12 % ± 0,77 %
	12	2167986 ± 7713	47,415 ± 0,169	94,91 % ± 1,24 %	12	1453224 ± 9143	31,783 ± 0,200	63,61 % ± 0,52 %
	15	2150825 ± 10507	47,040 ± 0,230	94,16 % ± 1,39 %	15	1290963 ± 5833	28,234 ± 0,128	56,51 % ± 0,35 %
	18	2141499 ± 6992	46,836 ± 0,153	93,75 % ± 1,17 %	18	1176564 ± 14416	25,732 ± 0,315	51,50 % ± 0,19 %
	21	2122376 ± 10806	46,418 ± 0,236	92,91 % ± 1,41 %	21	1057480 ± 8970	23,128 ± 0,196	46,29 % ± 0,19 %
	24	2091400 ± 5157	45,740 ± 0,113	91,55 % ± 0,80 %	24	908105 ± 9658	19,861 ± 0,211	39,75 % ± 0,11 %
	27	2090932 ± 10770	45,730 ± 0,236	91,53 % ± 1,14 %	27	819338 ± 15830	17,919 ± 0,346	35,86 % ± 0,55 %
	30	2048406 ± 13700	44,800 ± 0,300	89,67 % ± 1,32 %	30	722780 ± 14345	15,808 ± 0,314	31,64 % ± 0,37 %

Tabela 55. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach recepturowych w wersji IR, przechowywanych w temperaturze 4 ºC i 20 ºC przez 30 dni.

5 % krople do oczu z cefuroksymem – wersja IR – temperatura przechowywania 4 ºC i 20 ºC								
	Dzień	**Średnie pole powierzchni ± SD**	**Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)**	**Zmiana zawartości antybiotyku ± SD**	**Dzień**	**Średnie pole powierzchni ± SD**	**Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)**	**Zmiana zawartości antybiotyku ± SD**
Temperatura 4 ºC	0	2345210 ± 20630	51,291 ± 0,451	100 %	0	2345210 ± 20630	51,291 ± 0,451	100 %
	3	2297644 ± 18022	50,251 ± 0,394	97,98 % ± 1,61 %	3	2111381 ± 16735	46,177 ± 0,366	90,04 % ± 1,33 %
	6	2248017 ± 7019	49,165 ± 0,154	95,86 % ± 0,59 %	6	1883210 ± 14751	41,187 ± 0,323	80,30 % ± 0,37 %
	9	2211863 ± 15456	48,375 ± 0,338	94,32 % ± 1,48 %	9	1694780 ± 11339	37,066 ± 0,248	72,27 % ± 1,11 %
	12	2172924 ± 18573	47,523 ± 0,406	92,67 % ± 1,59 %	12	1527638 ± 12545	33,410 ± 0,274	65,15 % ± 1,10 %
	15	2149930 ± 14874	47,020 ± 0,325	91,68 % ± 1,10 %	15	1380196 ± 4062	30,186 ± 0,089	58,86 % ± 0,66 %
	18	2125606 ± 18412	46,488 ± 0,403	90,65 % ± 1,55 %	18	1243520 ± 7776	27,197 ± 0,170	53,03 % ± 0,75 %
	21	2120336 ± 30352	46,373 ± 0,664	90,43 % ± 2,08 %	21	1120567 ± 11060	24,507 ± 0,242	47,79 % ± 0,87 %
	24	2049574 ± 11633	44,825 ± 0,254	87,40 % ± 0,49 %	24	988224 ± 12721	21,613 ± 0,278	42,14 % ± 0,29 %
	27	2001222 ± 1433	43,768 ± 0,031	85,34 % ± 0,77 %	27	896772 ± 5452	19,613 ± 0,119	38,24 % ± 0,31 %
	30	1976430 ± 7475	43,226 ± 0,163	84,28 % ± 0,65 %	30	768961 ± 5085	16,818 ± 0,111	32,79 % ± 0,43 %

Tabela 56. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach recepturowych w wersji IIR, przechowywanych w temperaturze 4 ºC i 20 ºC przez 30 dni.

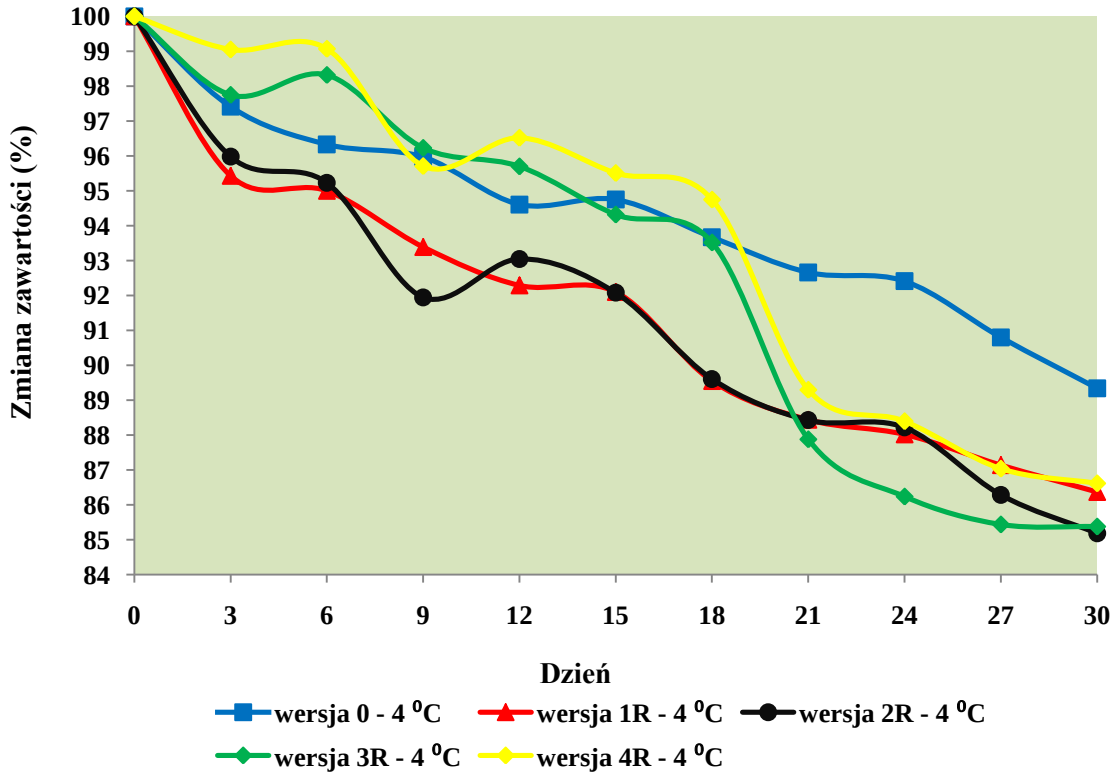
5 % krople do oczu z cefuroksymem – wersja IIR – temperatura przechowywania 4 ºC i 20 ºC								
	Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD		Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD
Temperatura 4 ºC	0	2357643 ± 22818	51,563 ± 0,499	100 %	Temperatura 20 ºC	0	2357643 ± 22818	51,563 ± 0,499	100 %
	3	2283090 ± 3589	49,933 ± 0,078	96,84 % ± 0,81 %		3	2099442 ± 10298	45,916 ± 0,225	89,05 % ± 0,44 %
	6	2231955 ± 17868	48,814 ± 0,391	94,67 % ± 0,30 %		6	1867053 ± 19178	40,834 ± 0,419	79,19 % ± 0,37 %
	9	2223308 ± 14168	48,625 ± 0,310	94,30 % ± 0,39 %		9	1710779 ± 10700	37,416 ± 0,234	72,57 % ± 0,33 %
	12	2193928 ± 39258	47,982 ± 0,859	93,05 % ± 0,95 %		12	1531695 ± 13612	33,499 ± 0,298	64,97 % ± 0,23 %
	15	2145714 ± 22095	46,928 ± 0,483	91,01 % ± 0,52 %		15	1373334 ± 23890	30,036 ± 0,522	58,25 % ± 0,83 %
	18	2104640 ± 12398	46,030 ± 0,271	89,27 % ± 0,79 %		18	1248306 ± 11896	27,301 ± 0,260	52,95 % ± 0,30 %
	21	2082809 ± 14060	45,552 ± 0,308	88,34 % ± 0,29 %		21	1090392 ± 9852	23,848 ± 0,215	46,25 % ± 0,57 %
	24	2089449 ± 12172	45,697 ± 0,266	88,63 % ± 0,54 %		24	1007862 ± 9772	22,043 ± 0,214	42,75 % ± 0,30 %
	27	2028363 ± 7477	44,362 ± 0,164	86,04 % ± 0,70 %		27	889014 ± 29238	19,443 ± 0,639	37,70 % ± 1,03 %
	30	2007342 ± 17783	43,902 ± 0,389	85,14 % ± 0,40 %		30	797044 ± 8323	17,432 ± 0,182	33,81 % ± 0,24 %

Tabela 57. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach recepturowych w wersji IIIR, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C przez 30 dni.

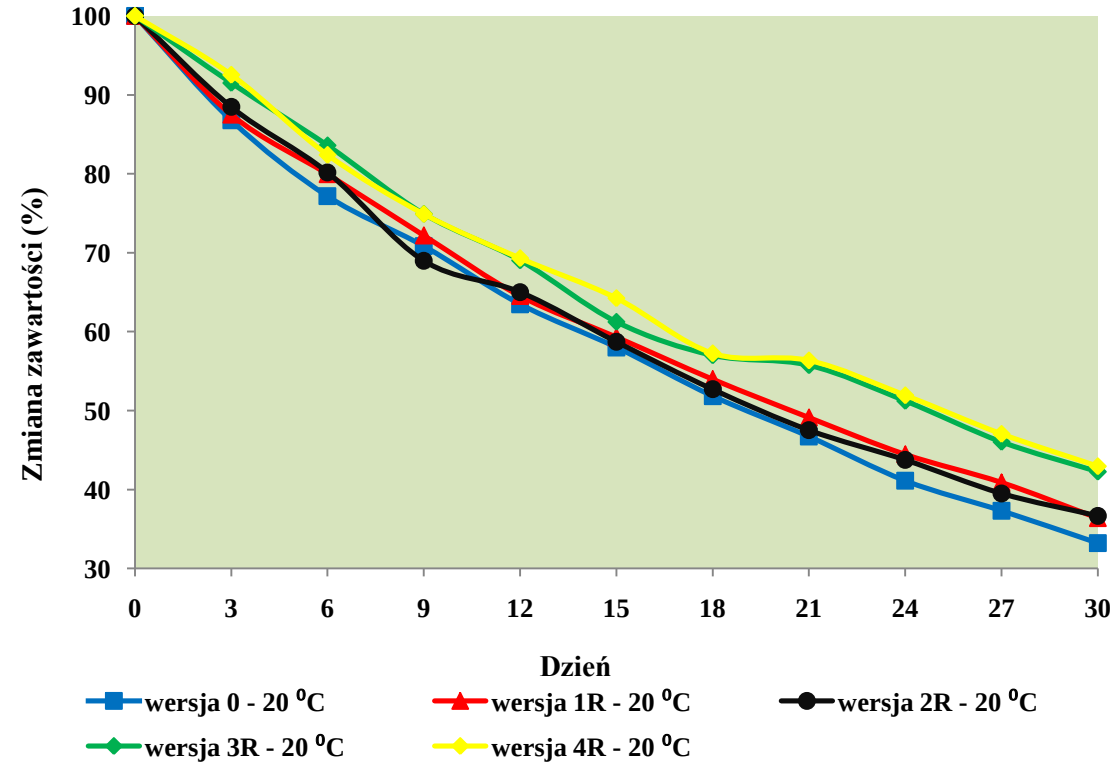
5 % krople do oczu z cefuroksymem – wersja IIIR – temperatura przechowywania 4 °C i 20 °C								
	Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD		Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD
Temperatura 4 °C	0	2342736 ± 26321	51,911 ± 0,583	100 %	Temperatura 20 °C	0	2342736 ± 26321	51,911 ± 0,583	100 %
	3	2291076 ± 36481	50,766 ± 0,808	97,80 % ± 1,59%		3	2108148 ± 31199	46,713 ± 0,691	89,99 % ± 1,37 %
	6	2250674 ± 41116	49,871 ± 0,911	96,07 % ± 1,79 %		6	1919659 ± 28619	42,536 ± 0,634	81,94 % ± 1,25 %
	9	2231654 ± 37682	49,450 ± 0,835	95,26 % ± 1,65 %		9	1698510 ± 55013	37,636 ± 1,219	72,50 % ± 2,38 %
	12	2247589 ± 16207	49,803 ± 0,359	95,94 % ± 0,72%		12	1571331 ± 15826	34,818 ± 0,351	67,07 % ± 0,70 %
	15	2213309 ± 23865	49,043 ± 0,529	94,48 % ± 1,06 %		15	1435134 ± 20552	31,800 ± 0,455	61,26 % ± 0,90 %
	18	2219961 ± 24932	49,191 ± 0,552	94,76 % ± 1,10 %		18	1294710 ± 19830	28,689 ± 0,439	55,27 % ± 0,87 %
	21	2197398 ± 32374	48,691 ± 0,717	93,80 % ± 1,42 %		21	1152856 ± 38252	25,545 ± 0,848	49,21 % ± 1,65 %
	24	2154383 ± 28195	47,738 ± 0,625	91,96 % ± 1,24 %		24	1055924 ± 7147	23,398 ± 0,158	45,07 % ± 0,31 %
	27	2138885 ± 15128	47,394 ± 0,335	91,30 % ± 0,68 %		27	938638 ± 17610	20,799 ± 0,390	40,07 % ± 0,77 %
	30	2130913 ± 17705	47,217 ± 0,392	90,96 % ± 0,77 %		30	871936 ± 15293	19,321 ± 0,339	37,22 % ± 0,67 %

Tabela 58. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach recepturowych w wersji IVR, przechowywanych w temperaturze 4 ºC i 20 ºC przez 30 dni.

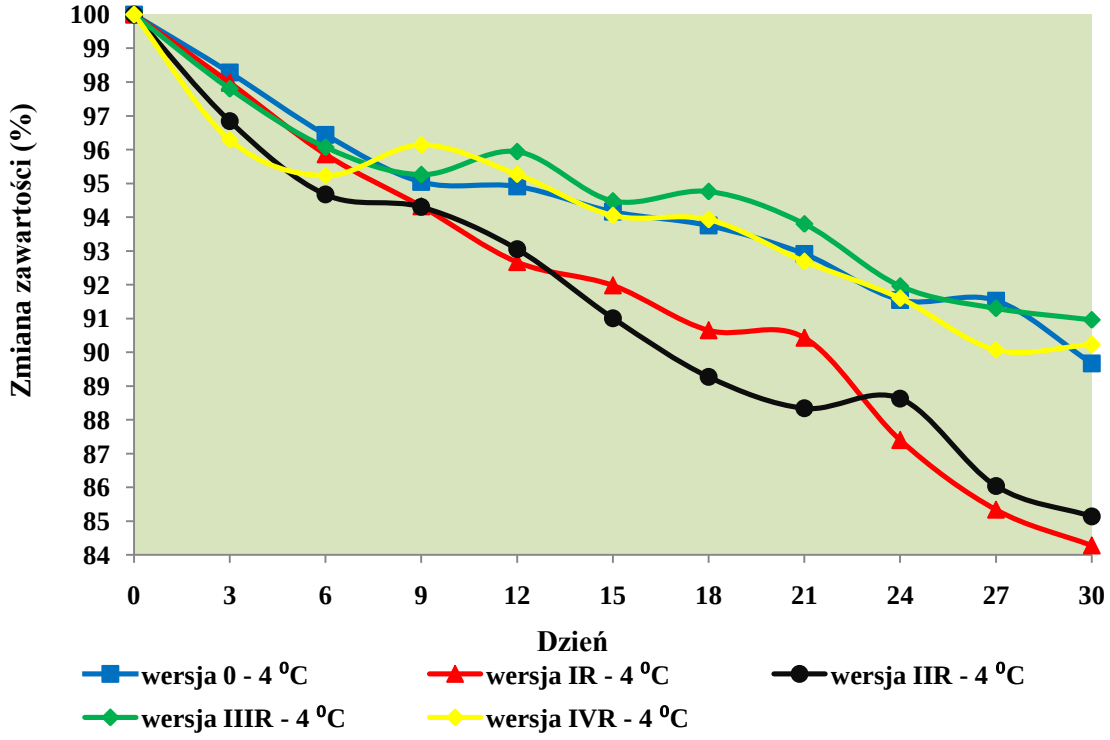
5 % krople do oczu z cefuroksymem – wersja IVR – temperatura przechowywania 4 ºC i 20 ºC								
Temperatura 4 ºC	**Dzień**	**Średnie pole powierzchni ± SD**	**Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)**	**Zmiana zawartości antybiotyku ± SD**	**Temperatura 20 ºC**	**Dzień**	**Średnie pole powierzchni ± SD**	**Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)**	**Zmiana zawartości antybiotyku ± SD**
	0	2373222 ± 28276	52,587 ± 0,627	100 %		0	2373222 ± 28276	52,587 ± 0,627	100 %
	3	2284943 ± 28331	50,631 ± 0,628	96,29 % ± 2,00 %		3	2132164 ± 23141	47,245 ± 0,513	89,84 % ± 0,80 %
	6	2259911 ± 24810	50,076 ± 0,550	95,23 % ± 0,59 %		6	1926659 ± 26742	42,692 ± 0,593	81,18 % ± 0,49 %
	9	2281444 ± 16515	50,553 ± 0,366	96,14 % ± 1,16 %		9	1727520 ± 16293	38,279 ± 0,361	72,80 % ± 1,16 %
	12	2271559 ± 21911	50,334 ± 0,486	95,72 % ± 1,24 %		12	1593708 ± 6036	35,314 ± 0,134	67,16 % ± 0,53 %
	15	2231756 ± 4956	49,452 ± 0,110	94,05 % ± 0,93 %		15	1444021 ± 10088	31,997 ± 0,224	60,85 % ± 0,81 %
	18	2228974 ± 3161	49,390 ± 0,070	93,93 % ± 0,83 %		18	1319952 ± 13523	29,248 ± 0,300	55,62 % ± 0,89 %
	21	2199621 ± 19464	48,740 ± 0,431	92,69 % ± 0,45 %		21	1178888 ± 11069	26,122 ± 0,245	49,68 % ± 0,76 %
	24	2173864 ± 21862	48,169 ± 0,484	91,60 % ± 1,12 %		24	1074638 ± 7213	23,812 ± 0,160	45,29 % ± 0,53 %
	27	2137529 ± 27541	47,364 ± 0,610	90,07 % ± 0,86 %		27	958327 ± 14284	21,235 ± 0,317	40,38 % ± 0,31 %
	30	2141144 ± 6549	47,444 ± 0,145	90,23 % ± 1,05 %		30	901125 ± 14550	19,967 ± 0,322	37,97 % ± 0,69 %



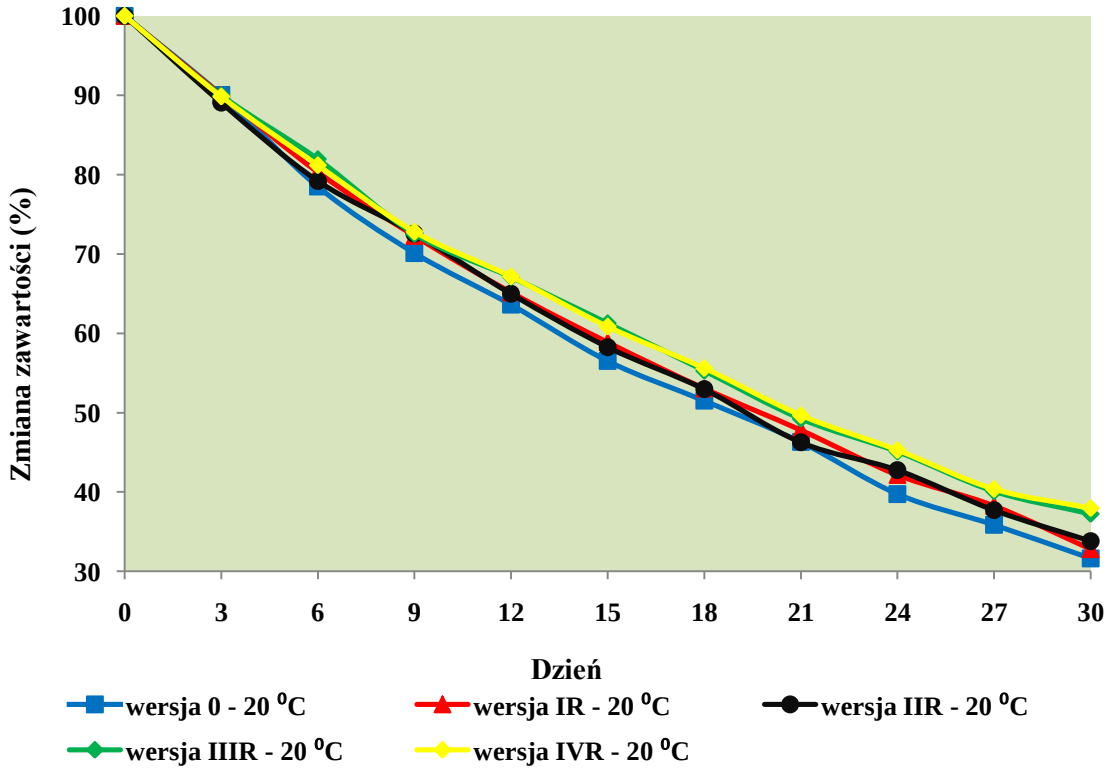
Rycina 56. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % roztworach wodnych i kroplach recepturowych, przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C.



Rycina 57. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % roztworach wodnych i kroplach recepturowych, przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 20 °C.



Rycina 58. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % roztworach wodnych i kroplach recepturowych, przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C.



Rycina 59. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % roztworach wodnych i kroplach recepturowych, przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 20 °C.

.

Tabela 59. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach „przemysłowych” w wersji 1P0 i 2P0, przechowywanych w temperaturze 4 °C przez 30 dni.

1 % krople do oczu z cefuroksymem – wersja 1P0 i 2P0 – temperatura przechowywania 4 °C								
	Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD	Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD
wersja 1P0	0	2373080 ± 11164	10,334 ± 0,049	100%	0	2360027 ± 9122	10,277 ± 0,040	100 %
	3	2317206 ± 2614	10,090 ± 0,011	97,65 % ± 0,17 %	3	2313884 ± 6389	10,076 ± 0,028	98,05 % ± 0,51 %
	6	2294975 ± 2090	9,993 ± 0,009	96,71 % ± 0,17 %	6	2290267 ± 7975	9,973 ± 0,035	97,04 % ± 0,36 %
	9	2279769 ± 3401	9,927 ± 0,015	96,07 % ± 0,16 %	9	2273833 ± 7668	9,901 ± 0,033	96,35 % ± 0,49 %
	12	2245111 ± 4048	9,776 ± 0,018	94,61 % ± 0,10 %	12	2237346 ± 9528	9,743 ± 0,041	94,80 % ± 0,65 %
	15	2208820 ± 6674	9,618 ± 0,029	93,08 % ± 0,25 %	15	2208224 ± 5786	9,616 ± 0,025	93,57 % ± 0,47 %
	18	2187725 ± 8078	9,526 ± 0,035	92,19 % ± 0,28 %	18	2192034 ± 13269	9,545 ± 0,058	92,88 % ± 0,67 %
	21	2168127 ± 12774	9,441 ± 0,056	91,36 % ± 0,49 %	21	2169334 ± 5939	9,446 ± 0,026	91,92 % ± 0,37 %
	24	2155178 ± 8703	9,385 ± 0,038	90,82 % ± 0,30 %	24	2168916 ± 7926	9,445 ± 0,035	91,90 % ± 0,12 %
	27	2129558 ± 9506	9,273 ± 0,041	89,74 % ± 0,39 %	27	2120545 ± 11058	9,234 ± 0,048	89,85 % ± 0,51 %
	30	2100025 ± 15338	9,145 ± 0,067	88,49 % ± 0,66 %	30	2100968 ± 16103	9,149 ± 0,070	89,02 % ± 0,69 %

Tabela 60. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach „przemysłowych” w wersji 3P0 i 4P0, przechowywanych w temperaturze 4 °C przez 30 dni.

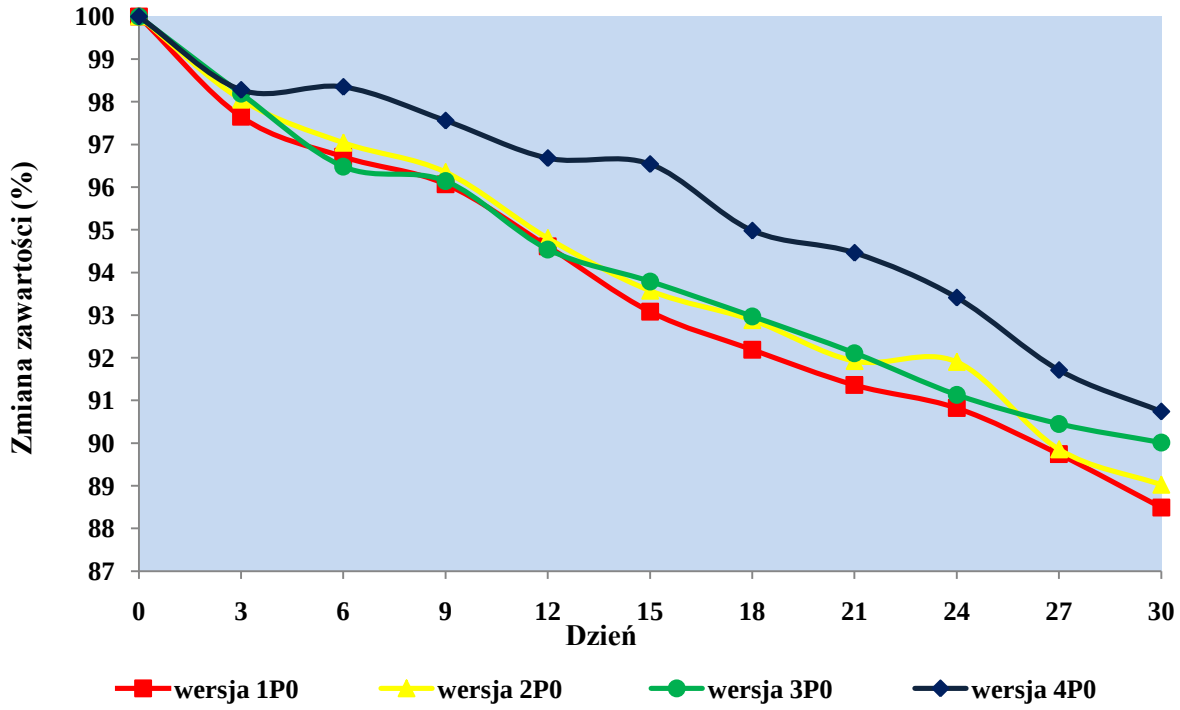
1 % krople do oczu z cefuroksymem – wersja 3P0 i 4P0 – temperatura przechowywania 4 °C								
	Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD	Dzień	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD
wersja 3P0	0	2356305 ± 8751	10,261 ± 0,038	100%	0	2322633 ± 10473	10,114 ± 0,046	100%
	3	2313588 ± 6025	10,074 ± 0,026	98,19 % ± 0,30 %	3	2282649 ± 13045	9,940 ± 0,057	98,28 % ± 0,64 %
	6	2273430 ± 4349	9,900 ± 0,019	96,48 % ± 0,34 %	6	2284216 ± 11001	9,947 ± 0,048	98,35 % ± 0,55 %
	9	2265395 ± 2552	9,865 ± 0,011	96,14 % ± 0,28 %	9	2266044 ± 5363	9,867 ± 0,023	97,56 % ± 0,24 %
	12	2227589 ± 12707	9,700 ± 0,055	94,54 % ± 0,45 %	12	2245588 ± 10678	9,778 ± 0,046	96,68 % ± 0,40 %
	15	2209942 ± 7144	9,623 ± 0,031	93,79 % ± 0,33 %	15	2242278 ± 15362	9,764 ± 0,067	96,54 % ± 0,73 %
	18	2190618 ± 12548	9,539 ± 0,055	92,97 % ± 0,31 %	18	2205983 ± 11119	9,606 ± 0,048	94,98 % ± 0,41 %
	21	2170299 ± 10651	9,451 ± 0,046	92,11 % ± 0,27 %	21	2193934 ± 11379	9,553 ± 0,050	94,46 % ± 0,53 %
	24	2147276 ± 11036	9,350 ± 0,048	91,13 % ± 0,42 %	24	2169603 ± 12241	9,448 ± 0,053	93,41 % ± 0,51 %
	27	2131164 ± 11234	9,280 ± 0,049	90,45 % ± 0,52 %	27	2130062 ± 20972	9,275 ± 0,091	91,71 % ± 0,81 %
	30	2121024 ± 22636	9,236 ± 0,099	90,01 % ± 0,77 %	30	2107505 ± 6786	9,177 ± 0,030	90,74 % ± 0,25 %

Tabela 61. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach „przemysłowych” w wersji IP0 i IIP0, przechowywanych w temperaturze 4 °C przez 30 dni.

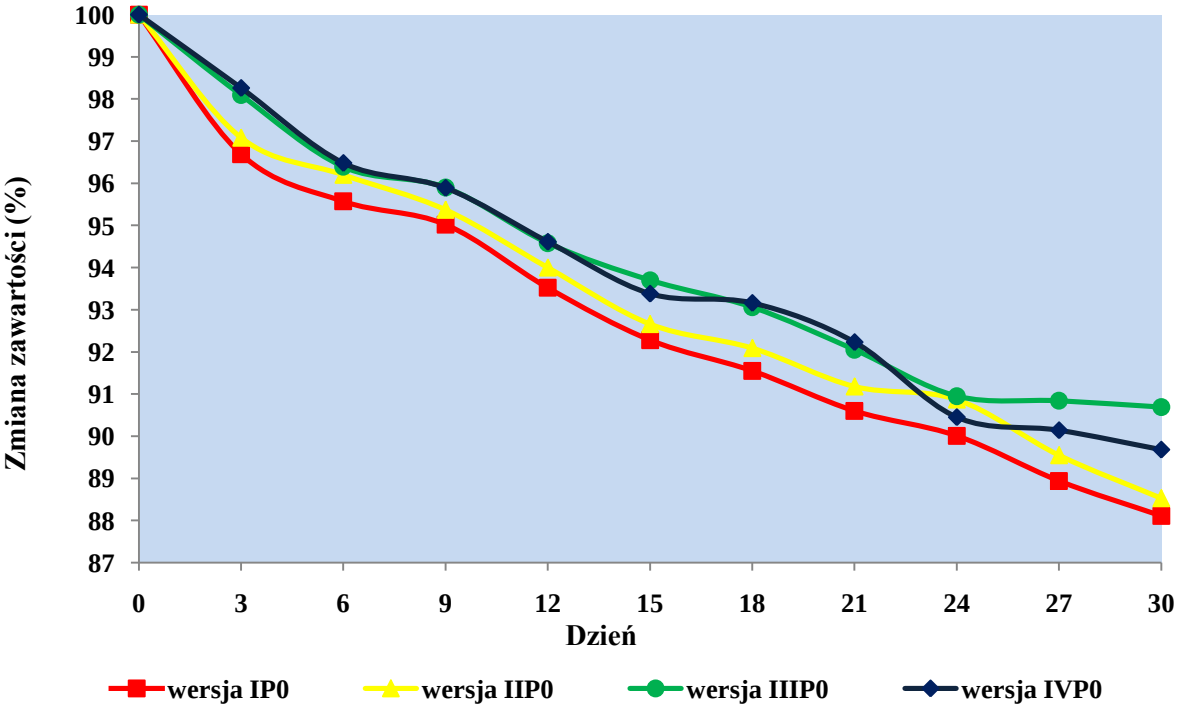
5 % krople do oczu z cefuroksymem – wersja IP0 i IIP0 – temperatura przechowywania 4 °C								
	Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD		Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD
wersja IP0	0	2405763 ± 12010	52,379 ± 0,261	100%	wersja IIP0	0	2393902 ± 11959	52,121 ± 0,260	100%
	3	2326201 ± 6568	50,647 ± 0,143	96,69 % ± 0,27 %		3	2323916 ± 5145	50,597 ± 0,112	97,08 % ± 0,49 %
	6	2299299 ± 2143	50,061 ± 0,047	95,57 % ± 0,12 %		6	2302932 ± 3444	50,140 ± 0,075	96,20 % ± 0,44 %
	9	2285909 ± 3410	49,770 ± 0,074	95,02 % ± 0,12 %		9	2282901± 6834	49,704 ± 0,149	95,37 % ± 0,69 %
	12	2249774 ± 5830	48,983 ± 0,127	93,52 % ± 0,21 %		12	2250303 ± 4427	48,995 ± 0,096	94,00 % ± 0,47 %
	15	2219941 ± 4214	48,334 ± 0,092	92,28 % ± 0,15 %		15	2218177 ± 3582	48,295 ± 0,078	92,66 % ± 0,55 %
	18	2202472 ± 10838	47,953 ± 0,236	91,55 % ± 0,45 %		18	2204447 ± 6464	47,996 ± 0,141	92,09 % ± 0,65 %
	21	2179540 ± 6133	47,454 ± 0,134	90,60 % ± 0,23 %		21	2182768 ± 4795	47,524 ± 0,104	91,18 % ± 0,55 %
	24	2165511 ± 5107	47,149 ± 0,111	90,01 % ± 0,18 %		24	2175226 ± 6471	47,360 ± 0,141	90,87 % ± 0,19 %
	27	2139769 ± 6545	46,588 ± 0,143	88,94 % ± 0,24 %		27	2143787 ± 3813	46,676 ± 0,083	89,55 % ± 0,45 %
	30	2119837 ± 7703	46,154 ± 0,168	88,11 % ± 0,29 %		30	2119341 ± 3304	46,143 ± 0,072	88,53 % ± 0,31 %

Tabela 62. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach „przemysłowych” w wersji IIIP0 i IVP0, przechowywanych w temperaturze 4 °C przez 30 dni.

5 % krople do oczu z cefuroksymem – wersja IIIP0 i IVP0 – temperatura przechowywania 4 °C								
	Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD	Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD
wersja IIIP0	0	2370091 ± 6409	51,603 ± 0,140	100 %	0	2356751 ± 16057	51,312 ± 0,350	100 %
	3	2324892 ± 5516	50,619 ± 0,120	98,09 % ± 0,39 %	3	2315638 ± 9960	50,417 ± 0,217	98,26 % ± 0,43 %
	6	2284585 ± 6270	49,741 ± 0,137	96,39 % ± 0,18 %	6	2273876 ± 4609	49,508 ± 0,100	96,48 % ± 0,20 %
	9	2272952 ± 5384	49,488 ± 0,117	95,90 % ± 0,28 %	9	2259788 ± 8423	49,201 ± 0,183	95,89 % ± 0,35 %
	12	2241688 ± 4810	48,807 ± 0,105	94,58 % ± 0,21 %	12	2229631 ± 8614	48,545 ± 0,188	94,61 % ± 0,35 %
	15	2220889 ± 6075	48,354 ± 0,132	93,70 % ± 0,10 %	15	2200657 ± 5542	47,914 ± 0,121	93,38 % ± 0,24 %
	18	2205711 ± 11436	48,024 ± 0,249	93,06 % ± 0,37 %	18	2195493 ± 7246	47,801 ± 0,158	93,16 % ± 0,32 %
	21	2181742 ± 10197	47,502 ± 0,222	92,05 % ± 0,28 %	21	2173530 ± 13366	47,323 ± 0,291	92,23 % ± 0,58 %
	24	2155509 ± 13863	46,931 ± 0,302	90,95 % ± 0,47 %	24	2131649 ± 2267	46,411 ± 0,049	90,45 % ± 0,09 %
	27	2152937 ± 9570	46,875 ± 0,208	90,84 % ± 0,34 %	27	2124377 ± 5104	46,253 ± 0,111	90,14 % ± 0,20 %
	30	2149432 ± 9169	46,798 ± 0,200	90,69 % ± 0,27 %	30	2113493 ± 10084	46,016 ± 0,220	89,68 % ± 0,43 %



Rycina 60. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach „przemysłowych" w wersjach P0, przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4 °C.



Rycina 61. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach „przemysłowych" w wersjach P0, przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4 °C.

Tabela 63. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach „przemysłowych” w wersji 1P6 i 2P6, przechowywanych w temperaturze 4 °C przez 30 dni.

1 % krople do oczu z cefuroksymem – wersja 1P6 i 2P6 – temperatura przechowywania 4 °C								
	Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD	Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD
wersja 1 P6	0	2367535 ± 7029	10,381 ± 0,031	100%	0	2371930 ± 3455	10,400 ± 0,015	100%
	3	2274821 ± 8298	9,974 ± 0,036	96,08 % ± 0,36 %	3	2270922 ± 8382	9,957 ± 0,037	95,74 % ± 0,31 %
	6	2253550 ± 6071	9,881 ± 0,027	95,19 % ± 0,24 %	6	2241235 ± 12111	9,827 ± 0,053	94,49 % ± 0,56 %
	9	2219686 ± 3376	9,733 ± 0,015	93,76 % ± 0,12 %	9	2208613 ± 5895	9,684 ± 0,026	93,11 % ± 0,29 %
	12	2209758 ± 9184	9,689 ± 0,040	93,34 % ± 0,41 %	12	2195074 ± 9136	9,625 ± 0,040	92,54 % ± 0,38 %
	15	2184691 ± 7836	9,579 ± 0,034	92,28 % ± 0,35 %	15	2166779 ± 3246	9,501 ± 0,014	91,35 % ± 0,11 %
	18	2159878 ± 11747	9,470 ± 0,052	91,23 % ± 0,52 %	18	2140978 ± 7841	9,388 ± 0,034	90,26 % ± 0,37 %
	21	2127899 ± 9883	9,330 ± 0,043	89,88 % ± 0,41 %	21	2109899 ± 10582	9,251 ± 0,046	88,95 % ± 0,44 %
	24	2101696 ± 11211	9,215 ± 0,049	88,77 % ± 0,48 %	24	2093306 ± 7488	9,179 ± 0,033	88,25 % ± 0,35 %
	27	2062752 ± 7696	9,045 ± 0,034	87,13 % ± 0,31 %	27	2056911 ± 3262	9,019 ± 0,014	86,72 % ± 0,14 %
	30	2053508 ± 10091	9,004 ± 0,044	86,74 % ± 0,42 %	30	2045058 ± 3514	8,967 ± 0,015	86,22 % ± 0,18 %

Tabela 64. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach „przemysłowych” w wersji 3P6 i 4P6, przechowywanych w temperaturze 4 °C przez 30 dni.

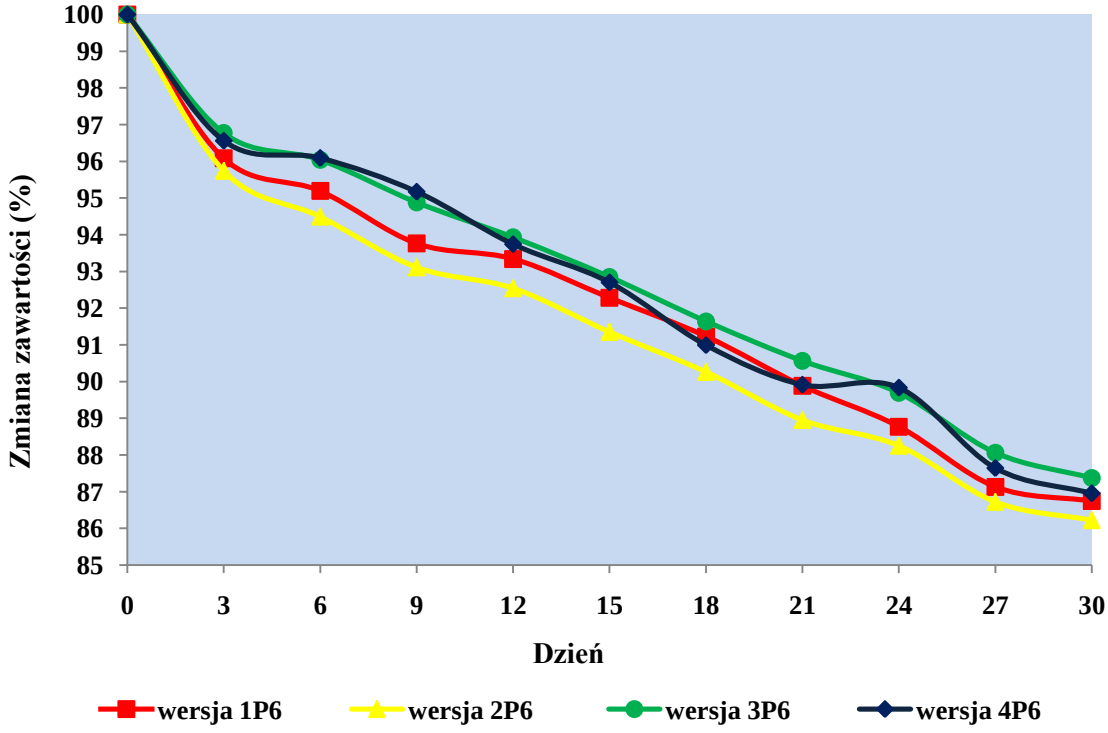
1 % krople do oczu z cefuroksymem – wersja 3P6 i 4P6 – temperatura przechowywania 4 °C								
	Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD	Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD
wersja 3P6 / wersja 4P6	0	2371892 ± 5355	10,400 ± 0,023	100%	0	2389195 ± 15561	10,476 ± 0,068	100%
	3	2295256 ± 8921	10,064 ± 0,039	96,77 % ± 0,32 %	3	2307018 ± 5783	10,116 ± 0,025	96,56 % ± 0,37 %
	6	2278044 ± 7436	9,989 ± 0,033	96,04 % ± 0,42 %	6	2295760 ± 11224	10,066 ± 0,049	96,09 % ± 0,49 %
	9	2250454 ± 6368	9,868 ± 0,028	94,88 % ± 0,34 %	9	2273842 ± 18630	9,970 ± 0,082	95,17 % ± 0,63 %
	12	2227847 ± 9918	9,768 ± 0,043	93,93 % ± 0,46 %	12	2239588 ± 5147	9,820 ± 0,023	93,74 % ± 0,29 %
	15	2202418 ± 8114	9,657 ± 0,036	92,85 % ± 0,24 %	15	2214888 ± 5271	9,712 ± 0,023	92,70 % ± 0,28 %
	18	2173629 ± 11843	9,531 ± 0,052	91,64 % ± 0,60 %	18	2173996 ± 13001	9,532 ± 0,057	90,99 % ± 0,60 %
	21	2148048 ± 10524	9,419 ± 0,046	90,56 % ± 0,36 %	21	2148045 ± 11566	9,419 ± 0,051	89,91 % ± 0,47 %
	24	2127277 ± 7371	9,328 ± 0,032	89,69 % ± 0,27 %	24	2146319 ± 5314	9,411 ± 0,023	89,83 % ± 0,23 %
	27	2088637 ± 12654	9,158 ± 0,055	88,06 % ± 0,44 %	27	2093922 ± 7481	9,181 ± 0,033	87,64 % ± 0,34 %
	30	2072290 ± 8033	9,086 ± 0,035	87,37 % ± 0,24 %	30	2077317 ± 5272	9,108 ± 0,023	86,95 % ± 0,31 %

Tabela 65. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach „przemysłowych” w wersji IP6 i IIP6, przechowywanych w temperaturze 4 °C przez 30 dni.

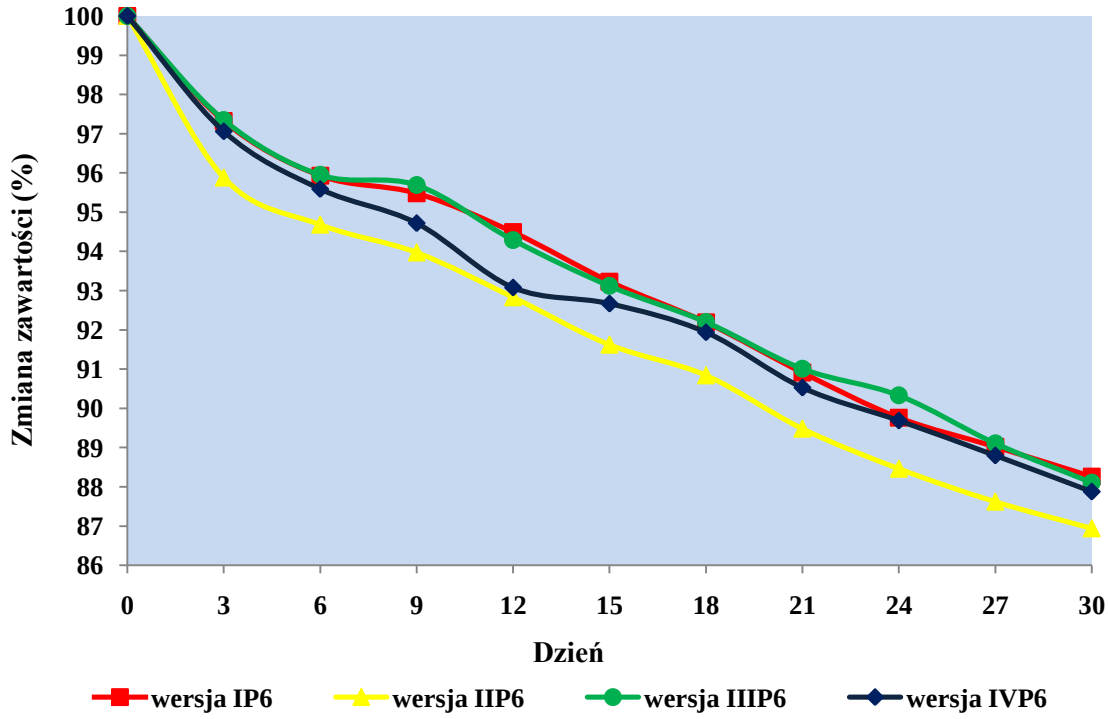
5 % krople do oczu z cefuroksymem – wersja IP6 i IIP6 – temperatura przechowywania 4 °C								
	Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD	Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD
wersja IP6	0	2346097 ± 8711	51,435 ± 0,191	100%	0	23777061 ± 7491	52,114 ± 0,164	100%
	3	2283289 ± 7466	50,058 ± 0,164	97,32 % ± 0,32 %	3	2279243 ± 4019	49,969 ± 0,088	95,88 % ± 0,14 %
	6	2250549 ± 5089	49,340 ± 0,112	95,93 % ± 0,26 %	6	2250540 ± 8497	49,340 ± 0,186	94,68 % ± 0,30 %
	9	2240118 ± 4204	49,112 ± 0,092	95,48 % ± 0,15 %	9	2233811 ± 5631	48,973 ± 0,123	93,97 % ± 0,18 %
	12	2216829 ± 4944	48,601 ± 0,108	94,49 % ± 0,18 %	12	2206512 ± 9189	48,375 ± 0,201	92,83 % ± 0,35 %
	15	2187258 ± 5627	47,953 ± 0,123	93,23 % ± 0,27 %	15	2177832 ± 5059	47,746 ± 0,111	91,62 % ± 0,22 %
	18	2162781 ± 9102	47,416 ± 0,200	92,19 % ± 0,43 %	18	2159250 ± 5959	47,339 ± 0,131	90,84 % ± 0,23 %
	21	2132904 ± 3390	46,761 ± 0,074	90,91 % ± 0,14 %	21	2127022 ± 14935	46,632 ± 0,327	89,48 % ± 0,58 %
	24	2105803 ± 11770	46,167 ± 0,258	89,76 % ± 0,47 %	24	2102651 ± 11360	46,098 ± 0,249	88,46 % ± 0,49 %
	27	2088438 ± 3504	45,786 ± 0,077	89,02 % ± 0,16 %	27	2082709 ± 16190	45,661 ± 0,355	87,62 % ± 0,63 %
	30	2070683 ± 7223	45,397 ± 0,158	88,26 % ± 0,30 %	30	2066605 ± 8282	45,307 ± 0,182	86,94 % ± 0,30 %

Tabela 66. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach „przemysłowych” w wersji IIIP6 i IVP6, przechowywanych w temperaturze 4 °C przez 30 dni.

5 % krople do oczu z cefuroksymem – wersja IIIP6 i IVP6 – temperatura przechowywania 4 °C								
	Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD		Dzień	Średnie pole powierzchni ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD (mg/mL)	Zmiana zawartości antybiotyku ± SD
wersja IIIP6	0	2356069 ± 3243	51,654 ± 0,071	100%	wersja IVP	0	2360379 ± 16196	51,748 ± 0,355	100%
	3	2293589 ± 6506	50,284 ± 0,143	97,35 % ± 0,31 %		3	2290920 ± 9300	50,225 ± 0,204	97,06 % ± 0,79 %
	6	2260718 ± 11084	49,563 ± 0,243	95,95 % ± 0,51 %		6	2256143 ± 3234	49,463 ± 0,071	95,59 % ± 0,52 %
	9	2254491 ± 4902	49,427 ± 0,107	95,69 % ± 0,26 %		9	2235723 ± 8550	49,015 ± 0,187	94,72 % ± 0,19 %
	12	2221496 ± 11260	48,703 ± 0,247	94,29 % ± 0,49 %		12	2197088 ± 8625	48,168 ± 0,189	93,08 % ± 0,78 %
	15	2194011 ± 9693	48,101 ± 0,213	93,12 % ± 0,45 %		15	2187264 ± 15617	47,953 ± 0,342	92,67 % ± 0,87 %
	18	2172353± 4853	47,626 ± 0,106	92,20 % ± 0,21 %		18	2170183 ± 6246	47,578 ± 0,137	91,94 % ± 0,31 %
	21	2144243 ± 5227	47,010 ± 0,115	91,01 % ± 0,27 %		21	2136916 ± 7180	46,849 ± 0,157	90,53 % ± 0,39 %
	24	2128149 ± 3684	46,657 ± 0,081	90,33 % ± 0,20 %		24	2116976 ± 4072	46,412 ± 0,089	89,69 % ± 0,28 %
	27	2099435 ± 4107	46,027 ± 0,090	89,11 % ± 0,16 %		27	2096014 ± 2587	45,952 ± 0,057	88,80 % ± 0,41 %
	30	2075898 ± 2993	45,511 ± 0,066	88,11 % ± 0,14 %		30	2074340 ± 7722	45,477 ± 0,169	87,88 % ± 0,16%



Rycina 62. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach „przemysłowych" w wersjach P6, przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C.

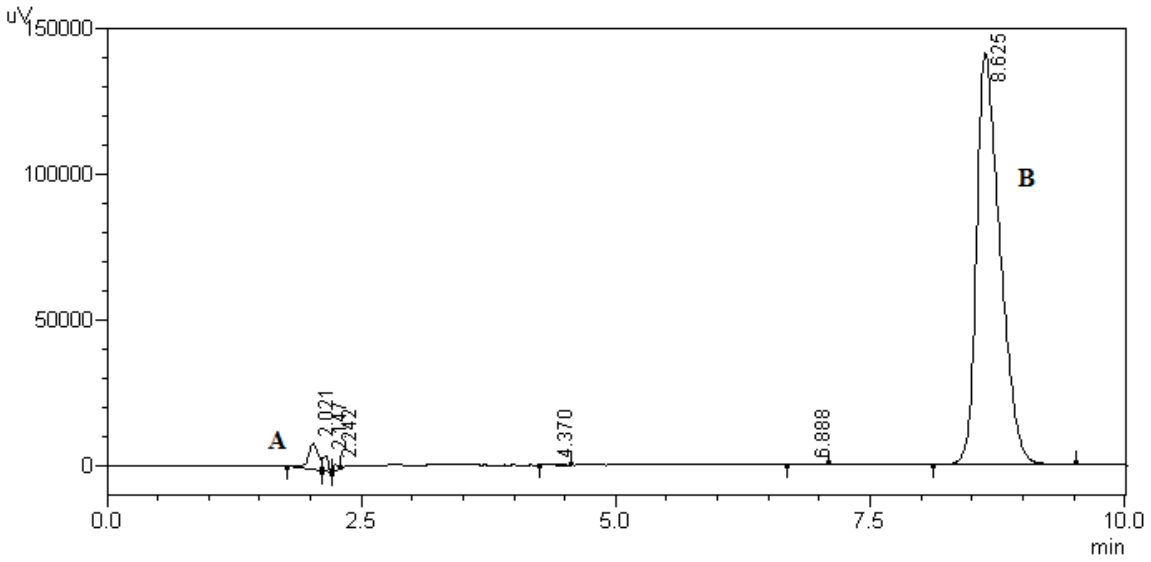


Rycina 63. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach „przemysłowych" w wersjach P6, przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C.

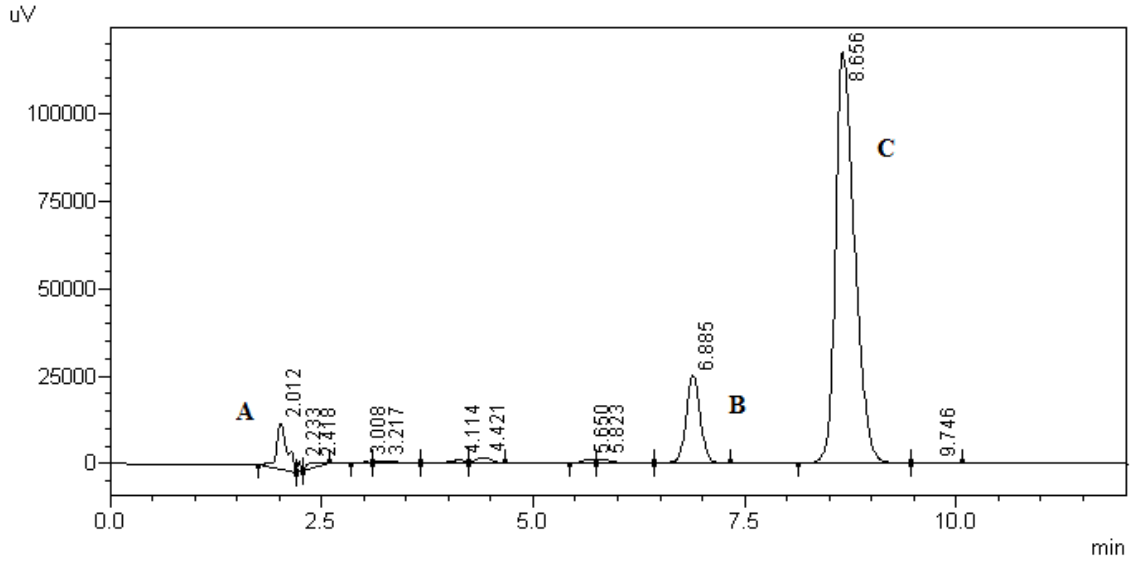
12. Produkty rozkładu cefuroksymu sodowego.

Zgodnie z warunkami przytoczonymi w piśmiennictwie [59], 1% roztwór wodny cefuroksymu sodowego o pH 7,4 poddano warunkom stresowym, ogrzewając próbę przez 10 min w temperaturze 60 ºC. Analogicznie postąpiono rozpuszczając cefuroksym sodowy w buforze cytrynianowym o pH 3,8 i pH 6,5. Chromatogramy świeżo sporządzonych roztworów oraz poddanych ekspozycji na podwyższoną temperaturę zilustrowano na rycinach 64 - 69. Ponadto na rycinie 70 umieszczono widmo UV cefuroksymu sodowego i widmo UV głównego produktu rozkładu antybiotyku pojawiającego się na chromatogramie przy czasie retencji t_R = 6,8.

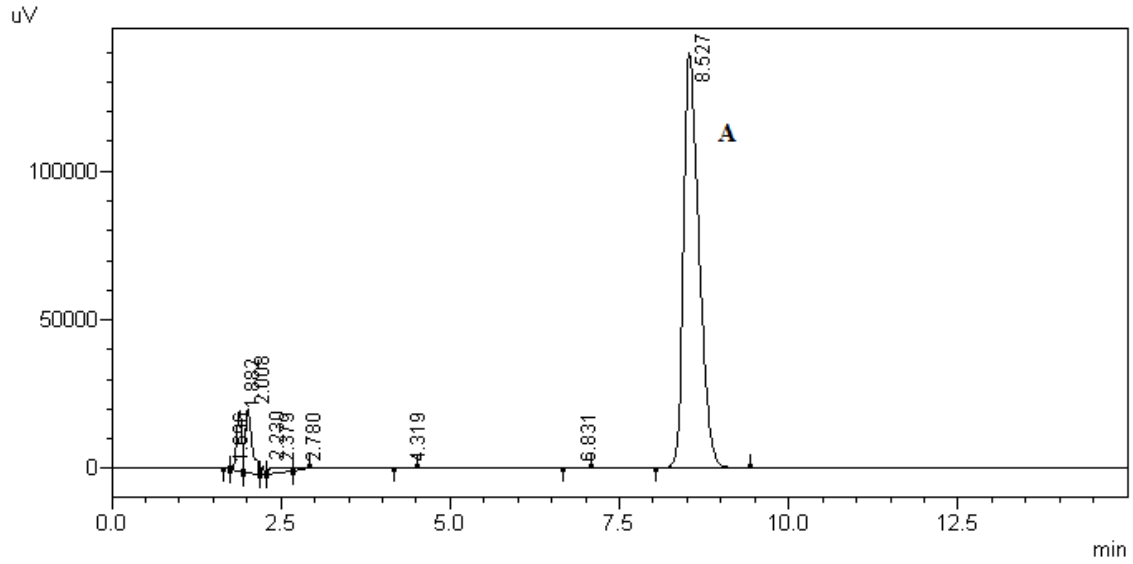
Dla porównania rozkładu antybiotyku przebiegającego w środowisku wodnym o pH 3,8 – 7,4, sporządzono równocześnie 1 % i 5 % roztwory cefuroksymu sodowego w 0,1 mol/L roztworze NaOH oraz w 1 % roztworze trietyloaminy, których pH mieściło się w zakresie 12 - 13. Z uwagi na szybki rozkład cefuroksymu sodowego w środowisku zasadowym, analizie chromatograficznej poddano tylko świeżo sporządzone roztwory. Wyniki badań przedstawiono na rycinach 71 - 74 i w tabeli 67.



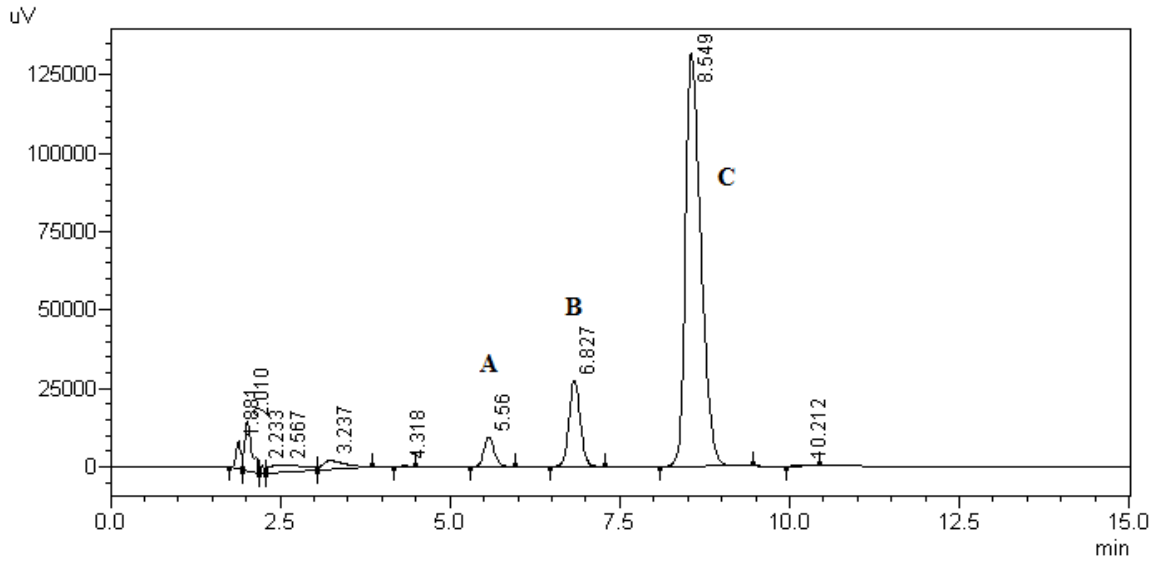
Rycina 64. Chromatogram świeżo sporządzonego 1 % roztworu wodnego cefuroksymu sodowego. A- uracyl, B – pik cefuroksymu.



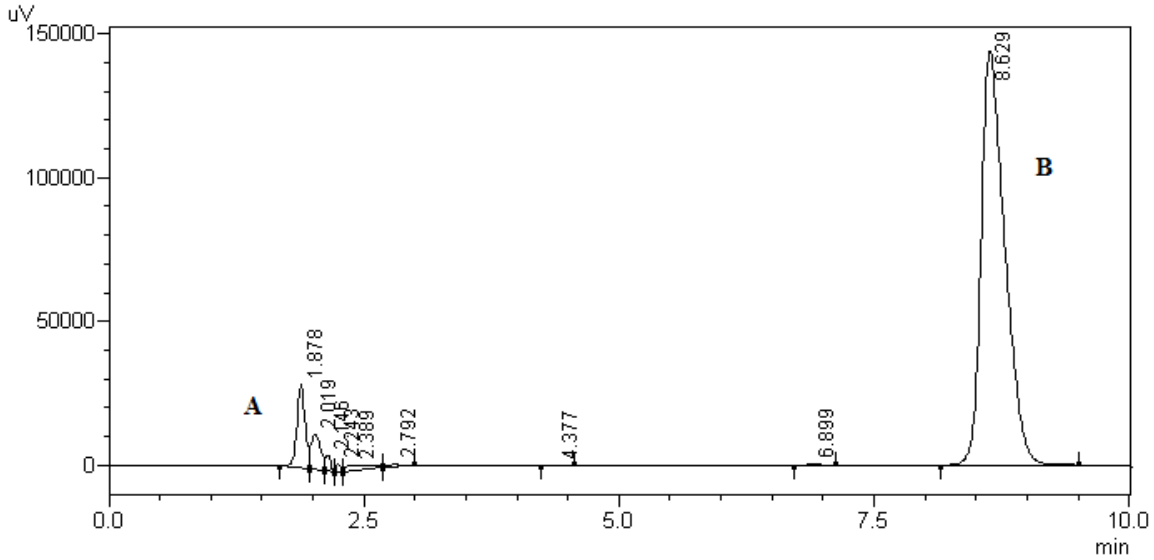
Rycina 65. Chromatogram 1% roztworu wodnego cefuroksymu sodowego, ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 10 minut. A – pik uracylu, B – pik głównego produktu rozkładu, C – pik cefuroksymu.



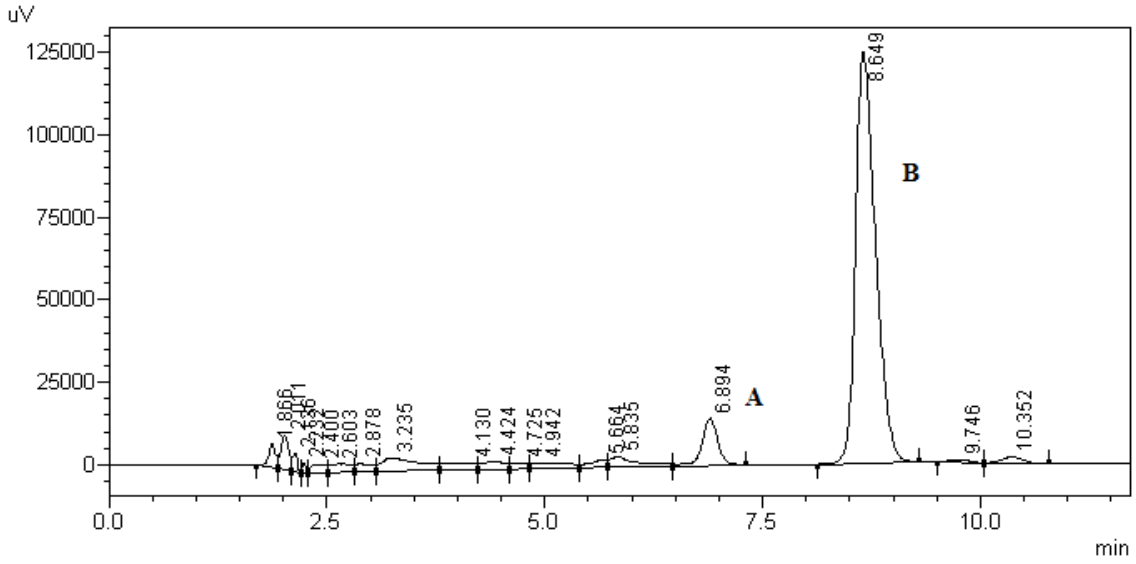
Rycina 66. Chromatogram świeżo sporządzonego 1 % roztworu cefuroksymu sodowego w buforze cytrynianowych o pH 3,8. A – pik cefuroksymu.



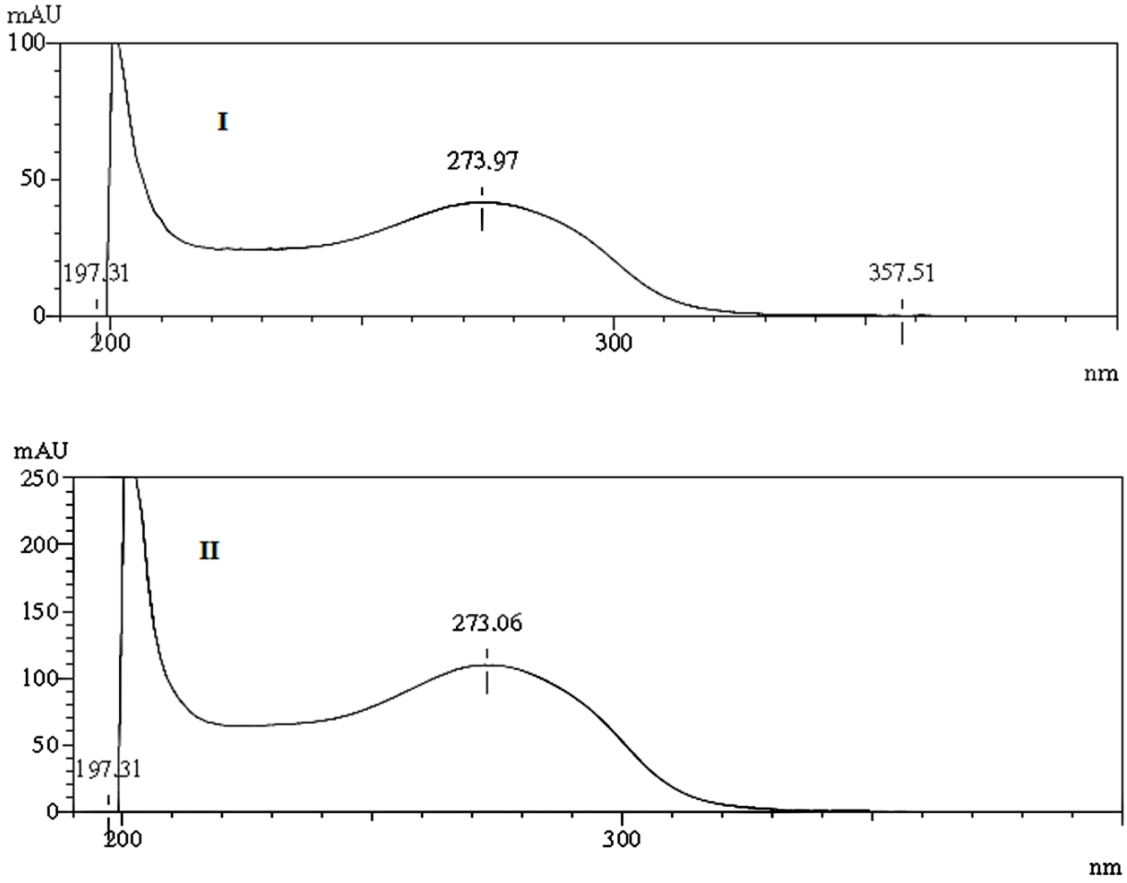
Rycina 67. Chromatogram 1% roztworu cefuroksymu sodowego w buforze cytrynianowym o pH 3,8, ogrzewanego w temperaturze 60 ºC przez 10 minut. A i B – piki produktów rozkładu antybiotyku, C – pik cefuroksymu.



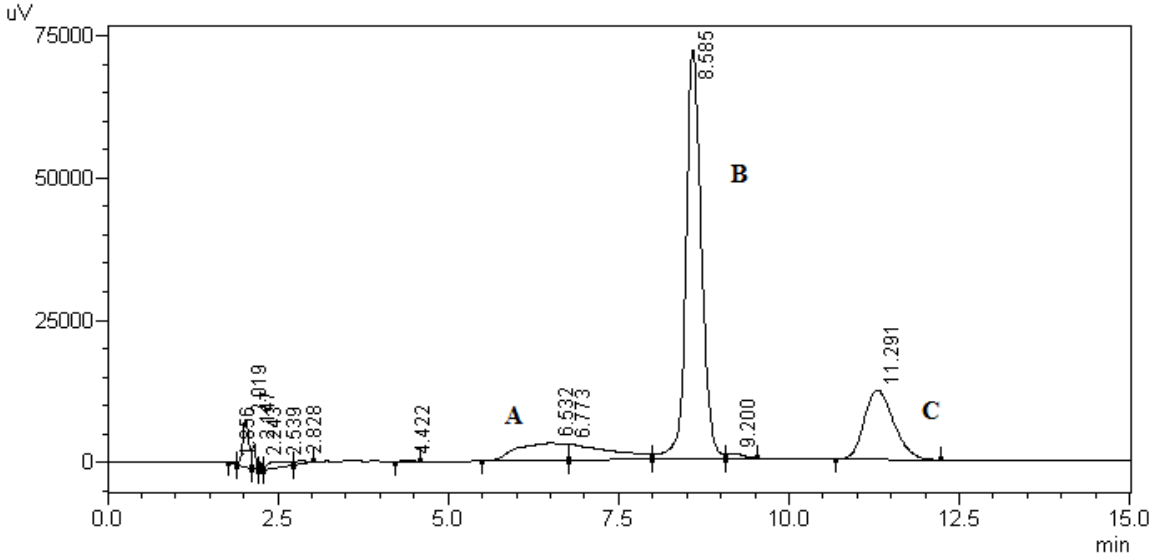
Rycina 68. Chromatogram świeżo sporządzonego 1 % roztworu cefuroksymu sodowego w buforze cytrynianowym o pH 6,5. A- uracyl, B – pik cefuroksymu.



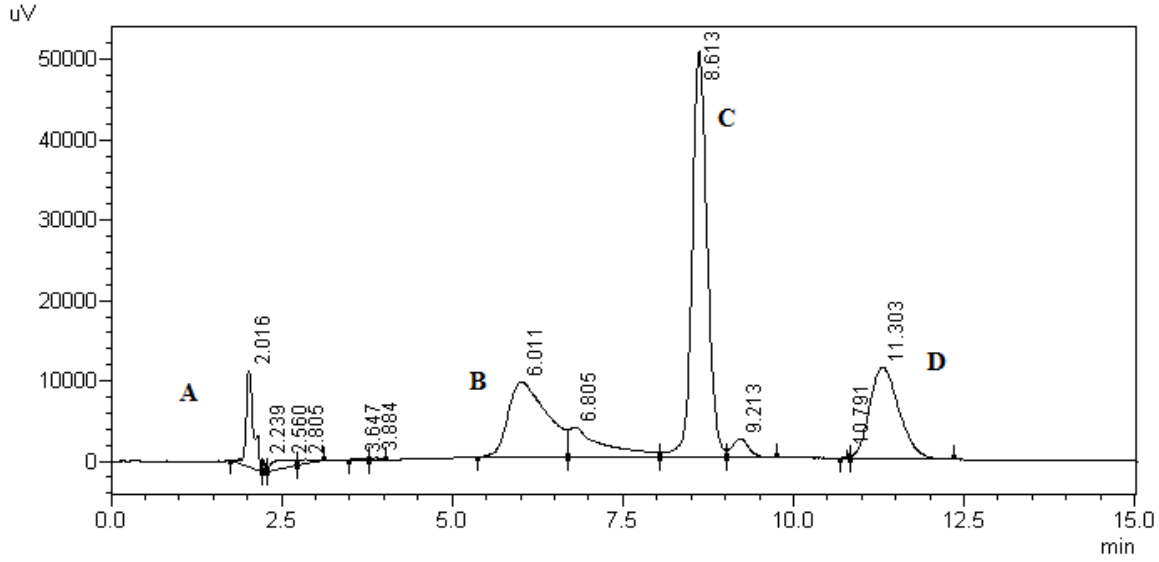
Rycina 69. Chromatogram 1% roztworu cefuroksymu sodowego w buforze cytrynianowym o pH 6,5, ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 10 minut. A – pik produktu rozkładu antybiotyku, B – pik cefuroksymu.



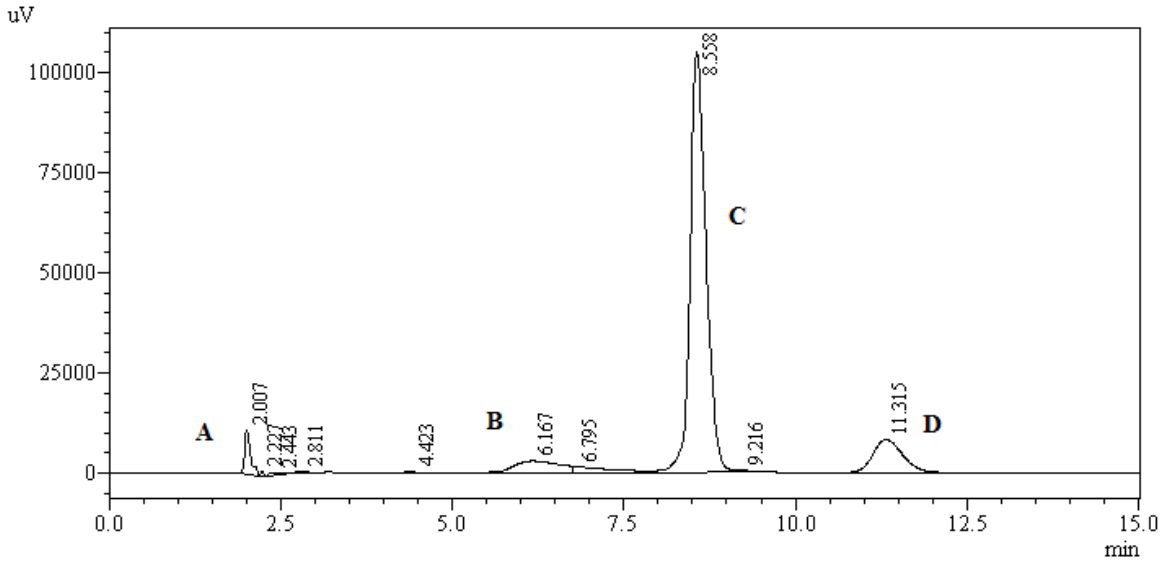
Rycina 70. Widmo UV w zakresie długości fali 200 – 400 nm. I – widmo UV głównego produktu rozkładu pojawiającego się na chromatogramach przy czasie retencji t_R = 6,8, II- widmo UV cefuroksymu sodowego.



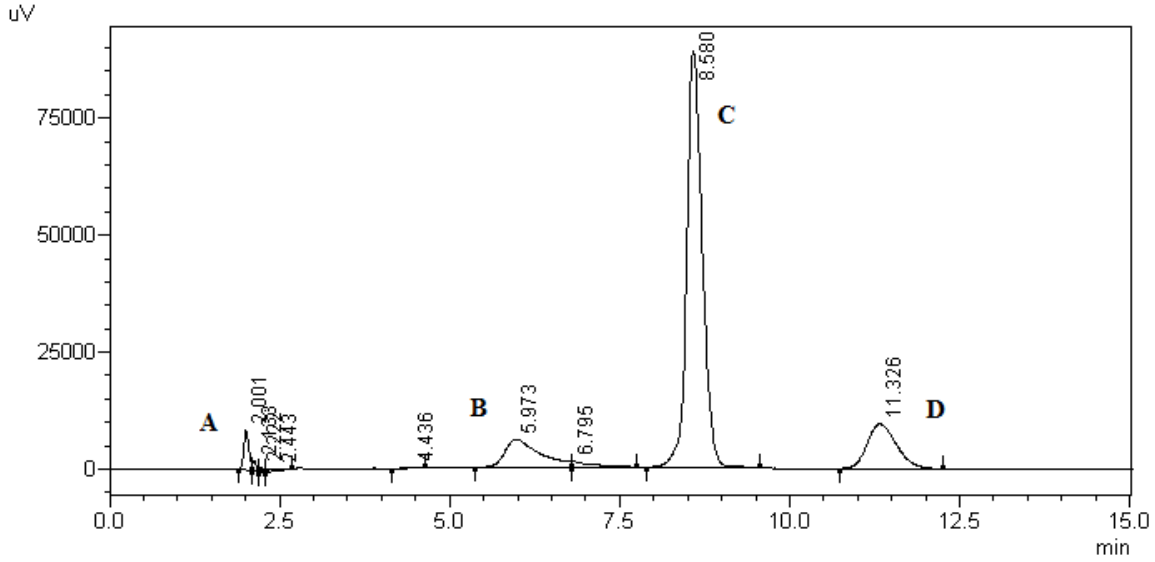
Rycina 71. Chromatogram świeżo sporządzonego 1 % roztworu cefuroksymu sodowego w 1 % roztworze trietyloaminy. A i C – piki produktów rozkładu antybiotyku, B – pik cefuroksymu.



Rycina 72. Chromatogram świeżo sporządzonego 1 % roztworu cefuroksymu sodowego w 0,1 mol/L roztworze NaOH. A – pik uracylu , B i D – piki produktów rozkładu antybiotyku, C – pik cefuroksymu.



Rycina 73. Chromatogram świeżo sporządzonego 5 % roztworu cefuroksymu sodowego w 1 % roztworze trietyloaminy. A – pik uracylu , B i D – piki produktów rozkładu antybiotyku, C – pik cefuroksymu.



Rycina 74. Chromatogram świeżo sporządzonego 5 % roztworu cefuroksymu sodowego w 0,1 mol/L roztworze NaOH. A – pik uracylu , B i D – piki produktów rozkładu antybiotyku, C – pik cefuroksymu.

Tabela 67. Spadek stężenia cefuroksymu w świeżo sporządzonych 1 % i 5 % (w/w) roztworach antybiotyku w 1% roztworze trietyloaminy i 0,1 mol/L roztworze NaOH.

Założone stężenie cefuroksymu sodowego w badanym roztworze	**Pole powierzchni cefuroksymu**	**Obliczone stężenie antybiotyku**	**Spadek zawartości (%)**
10 mg/mL cefuroksymu sodowego w 1 % roztworze trietyloaminy	1131805	5,02 mg/mL	↓ 49,84 %
10 mg/mL cefuroksymu sodowego w 0,1 mol/L roztworze NaOH	775829	3,44 mg/mL	↓ 65,62 %
50 mg/mL cefuroksymu sodowego w 1 % roztworze trietyloaminy	1698356	37,63 mg/mL	↓ 24,73 %
50 mg/mL cefuroksymu sodowego w 0,1 mol/L roztworze NaOH	1419651	31,46 mg/mL	↓ 37,09 %

V. Omówienie wyników

Cefuroksym – cefalosporyna II generacji, charakteryzuje się szerokim zakresem działania bakteriobójczego wobec większości bakterii wywołujących zakażenia oczu, w szczególności na *Staphylococcus* sp. *i Streptococcus* sp. [79]. Jest skuteczny wobec *Haemophilus influenzae,* większości pałeczek *Enterobacteriaceae, Neisseria* sp., *Moraxella catarrhalis* oraz wobec bakterii beztlenowych: laseczek *Clostridium* oraz pałeczek Gramm-ujemnych z rodzaju *Fusobacterium*. Do najważniejszych właściwości cefuroksymu oprócz szczególnej aktywności wobec *Staphylococcus* sp. i *Streptococcus* sp. należy jego oporność na β – laktamazy gronkowcowe (penicylinazy) oraz β – laktamazy plazmidowe o szerokim profilu substratowym typu TEM i SHV, które powodują szybką hydrolizę pierścienia β-laktamowego w cząsteczce antybiotyku, a tym samym utratę właściwości przeciwdrobnoustrojowych i w konsekwencji powstanie oporności bakterii na antybiotyk. Działanie przeciwdrobnoustrojowe cefuroksymu podobnie jak innych antybiotyków β-laktamowych zależy przede wszystkim od obecności w ich cząsteczce zamkniętego pierścienia β-laktamowego. Oporność cefuroksymu na hydrolityczne działanie enzymów bakteryjnych z grupy β – laktamaz czyni ten antybiotyk bardziej skutecznym, w porównaniu na przykład z penicylinami, w leczeniu zakażeń wywoływanych przez bakterie wytwarzające wspomniane enzymy. Zastosowanie cefuroksymu w kroplach do oczu w leczeniu bakteryjnych infekcji jest w pełni uzasadnione, ponieważ gronkowce i paciorkowce oraz wiele innych patogenów powodujących zakażenia oczu, wykazują dużą zdolność do produkcji β – laktamaz. Cefuroksym dobrze przenika z worka spojówkowego do cieczy wodnistej oka i jest mniej toksyczny wobec epithelium rogówki w porównaniu z innymi miejscowo stosowanymi antybiotykami np. aminoglikozydami [80].

Krople do oczu z cefuroksymem stanowiące wodne roztwory z uwagi na ograniczoną trwałość antybiotyku nie są produkowane jako preparaty handlowe. Sporządzane są przez apteki wyłącznie na potrzeby pacjentów oddziałów okulistycznych, najczęściej przez rozpuszczenie ex tempore w jałowej wodzie cefuroksymu sodowego, handlowej suchej postaci leku przeznaczonej do iniekcji dożylnych i domięśniowych [67]. Z uwagi na niskie ciśnienie osmotyczne tak otrzymanych roztworów, celowe staje się opracowanie technologii sporządzania 1 % i 5% kropli do oczu, które będą spełniały wymagania stawiane tej postaci leku zawarte w Farmakopei Polskiej VIII oraz

Farmakopei Polskiej V [41,81]. Ponadto w założeniu, świeżo sporządzone krople powinny charakteryzować się trwałością minimum kilkunastodniową, co pozwoliłoby pacjentom przeprowadzić pełną terapię przy zastosowaniu jednego opakowania preparatu.

Badania nad trwałością cefuroksymu sodowego w kroplach do oczu, będące tematem niniejszej pracy, są kontynuacją wcześniejszych analiz prowadzonych w Katedrze Technologii Postaci Leku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu [68,72], których wyniki pozwoliły na opatentowanie pełnej technologii sporządzania 1 % kropli z cefuroksymem w wersji recepturowej [82]. Słusznym krokiem wydaje się być, rozszerzenie już przeprowadzonych badań o technologię sporządzania kropli wzmocnionych, o stężeniu 5 % oraz o technologię sporządzania kropli w wersji handlowej, co pozwoli na szersze wykorzystanie w lecznictwie tej postaci leku. Ponadto celowe było wprowadzenie analizy trwałości chemicznej antybiotyku, za pomocą metody HPLC i odniesienie jej do już przeprowadzonych badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej cefuroksymu w 1 % kroplach do oczu, co pozwoliło na porównanie obu tych metod.

Cel niniejszej pracy realizowano etapowo. Do składu 5% kropli włączono te same substancje pomocnicze, które wcześniej wykorzystano w badaniach nad technologią sporządzania 1 % recepturowych kropli do oczu z cefuroksymem sodowym [68,72]. Jednak z uwagi na znaczne różnice w ciśnieniu osmotycznym 1 % i 5% roztworów cefuroksymu sodowego w wodzie, zmodyfikowano skład buforów cytrynianowych włączonych do składu 5 % kropli do oczu.

W pierwszym etapie badań dokonano testu zgodności farmaceutycznej 5 % roztworów wodnych cefuroksymu sodowego z substancjami pomocniczymi, które w założeniu pracy miały być włączone do składu kropli do oczu. Wyniki analizy przedstawiono w tabeli 6. Podczas dwutygodniowego przechowywania roztworów w temperaturze 4 °C i 20 °C nie stwierdzono interakcji. Wszystkie sporządzone roztwory pozostały klarowne. Zaobserwowano natomiast zmianę zabarwienia, która intensywniej przebiegała w temperaturze przechowywania 20 °C.

Do wykonania kropli z cefuroksymem sodowym w wersji recepturowej oraz rozpuszczalników do wersji przemysłowej kropli wykorzystano roztwory substancji pomocniczych, których tok sporządzania opisano w punkcie 4. W ramach oceny jakościowej buforów cytrynianowych, przed procesem wyjaławiania oraz bezpośrednio

po nim, dokonano pomiarów: pH i ciśnienia osmotycznego oraz przeprowadzono ocenę organoleptyczną pod kątem zmiany zabarwienia i klarowności, a w przypadku roztworu alkoholu powinylowego zmierzono dodatkowo lepkość (tabela 2 i tabela 4). Na podstawie przeprowadzonej oceny fizycznej, nie stwierdzono zmian w badanych buforach w wyniku procesu wyjaławiania, natomiast w roztworze alkoholu poliwinylowego doszło tylko do nieznacznego spadku lepkości z wartości 44,23 mPa•s do 42,31 mPa•s.

Metoda HPLC

Do oznaczania zmian zawartości cefuroksymu sodowego w badanych kroplach i roztworach wykorzystano wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), którą zwalidowano pod kątem: specyficzności, dokładności, precyzji i liniowości oraz wyznaczono granicę wykrywalności i oznaczalności cefuroksymu sodowego w trakcie całego cyklu badań. Ponadto dokonano oceny wpływu niewielkich zaplanowanych zmian na parametry analizy chromatograficznej – robustness.

Specyficzność. W badaniu specyficzności (punkt 11.4.1.) wykazano, że cytrynian sodu, kwas cytrynowy, boran fenylortęciowy, alkohol β-fenyloetylowy oraz alkohol poliwinylowy, występujące w składzie kropli do oczu, nie miały wpływu na wynik oznaczeń cefuroksymu sodowego, ponieważ przy długości fali 273 nm i czasie retencji charakterystycznym dla antybiotyku, na chromatogramach nie pojawiły się piki pochodzące od zastosowanych substancji pomocniczych.

Dokładność. Za miarę dokładności przyjęto procent odzysku antybiotyku z mieszanin modelowych o określonej zawartości cefuroksymu sodowego (punkt 11.4.2.). Dokładność oznaczeń cefuroksymu w 1% kroplach wynosiła od 97,96 % do 99,15 %, natomiast w 5 % od 99,03 % do 99,76 %.

Precyzja. Precyzję oznaczeń cefuroksymu sodowego w badanych kroplach określono podczas analizy mieszanin modelowych antybiotyku, poprzez obliczenie procentowego względnego odchylenia standardowego zwanego inaczej współczynnikiem zmienności (Wz). Współczynnik zmienności, obliczony na podstawie pól powierzchni otrzymanych z trzech nastrzyków dla każdej mieszaniny modelowej, wynosił dla 1 % kropli od 0,16 % do 0,59 %, natomiast dla 5 % kropli od 0,10 % do 0,78 % (punkt 11.4.3.).

Granica wykrywalności (DL) i granica oznaczalności(QL). Zarówno granicę wykrywalności i oznaczalności określono korzystając z współczynnika kierunkowego krzywej kalibracyjnej (a) oraz odchylenia standardowego (S_y) (punkt 11.4.4. i punkt 11.4.5.). Najwyższą wartość tych parametrów uzyskano na podstawie obliczeń z krzywej kalibracyjnej A, gdzie granica wykrywalności (DL) cefuroksymu sodowego wynosiła 3,60 μg/mL, a granica oznaczalności (QL) 10,91 μg/mL. W trakcie całego cyklu badań dokonano podobnych obliczeń, w oparciu o wszystkie wyznaczone krzywe wzorcowe. Różnice w otrzymanych wartościach DL i QL były mało istotne, ponieważ najniższy punkt na krzywej wzorcowej został wyznaczony dla stężeniu cefuroksymu sodowego w próbie równemu 25 μg/mL, czyli wartości odpowiadającej 75 % spadkowi zawartości antybiotyku kroplach do oczu w odniesieniu do wartości deklarowanej w dniu ich sporządzenia. Poza tym według wytycznych ICH Q2 (R1) [77] granicę wykrywalności (DL) i granicę oznaczalności (QL) należy wyznaczyć koniecznie podczas analizy ilościowej zanieczyszczeń, natomiast nie ma takiego wymogu odnośnie oznaczania ilościowego głównego analitu w matrycy.

Liniowość metody. W opracowanej metodzie ilościowego oznaczania cefuroksymu sodowego w kroplach i roztworach wodnych wyznaczono cztery krzywe wzorcowe, w zakresie stężeń cefuroksymu sodowego od około 25 μg/mL do około150 μg/mL, czyli od 25 % do 150 % deklarowanej zawartości antybiotyku w badanych kroplach w dniu ich sporządzenia (punkt 11.4.6.). Przeprowadzona analiza regresji potwierdziła istotność korelacji między oznaczonym polem powierzchni a stężeniem wzorca cefuroksymu sodowego w analizowanych próbach (punkt.11.3.1. i punkt.11.3.2.).

Robustness. W celu zbadania wpływu zaplanowanych zmian w opracowanej metodzie ilościowego oznaczania cefuroksymu sodowego w kroplach do oczu, na wartość uzyskanych pól powierzchni, a tym samym na wartość obliczonego stężenia analitu w badanej próbie, wprowadzono modyfikacje polegające na: zmianie temperatury kolumny chromatograficznej podczas prowadzenia rozdziału oraz na zmianie pH i ilości acetonitrylu w fazie ruchomej. Szczegółowy tok analizy przedstawiono w punkcie 11.4.7. W przypadku zmiany temperatury kolumny i ilości acetonitrylu w fazie ruchomej, stwierdzono następujące prawidłowości: im wyższa temperatura kolumny i im wyższa zawartość acetonitrylu w fazie ruchomej tym niższe uzyskano czasy retencji t_R cefuroksymu. Zmiany te nie wpłynęły istotnie na wartości uzyskanych pól powierzchni. Współczynnik zmienności dla trzech średnich pół powierzchni uzyskanych łącznie z dziewięciu nastrzyków mieszaniny modelowej (po trzy nastrzyki

dla każdych warunków rozdziału), podczas analizy prowadzonej w temperaturze 20 °C, 25 °C oraz 30 °C wynosił 0,003 % (tabela 45). Analogicznie dla trzech średnich pól powierzchni uzyskanych z analizy mieszaniny modelowej przy użyciu trzech faz ruchomych różniących się zawartością acetonitrylu: 90%, 100 % i 110 % (w odniesieniu do ilości wymaganej) współczynnik zmienności wynosił 0,088 % (tabela 46). Podczas prowadzenia oznaczeń chromatograficznych przy zastosowaniu faz ruchomych o pH w zakresie 3,3 – 3,5, uzyskano rozdział chromatograficzny przy podobnym czasie retencji t_R cefuroksymu, a współczynnik zmienności dla trzech średnich pól powierzchni wynosił 0,103 % (tabela 47). Przeprowadzona analiza dowiodła, że niewielkie zmiany w warunkach prowadzonego rozdziału chromatograficznego, których konsekwencją były uzyskane różne czasy retencji cefuroksymu, od t_R = 7,42 do t_R =9,86, nie wpłynęły na wielkość pól powierzchni oznaczanego analitu, a tym samym na obliczoną zawartość antybiotyku w badanych próbach.

Parametry rozdziału chromatograficznego. W trakcie oznaczeń zawartości cefuroksymu sodowego w badanych kroplach, oprócz pól powierzchni wyznaczono szereg parametrów chromatograficznych, których wartości świadczyły o sprawności oraz stałych warunkach prowadzonych rozdziałów. Współczynnik retencji k dla cefuroksymu sodowego w całym cyklu badań wynosił od około 3,2 do około 3,3.Ilość półek teoretycznych na metr dla zastosowanej kolumny wynosiła około 40000. W jednym dniu analizy odnotowano spadek tej wartości, który nie wpłynął na wynik oznaczeń. Minimalna rozdzielczość R_s dla cefuroksymu sodowego jaką uzyskano w całym cyklu badań wynosiła około 1,7. Współczynnik ogonowania piku $TF_{5\%}$ był nie wyższy niż 1,5. Chromatogramy oraz parametry rozdziału chromatograficznego cefuroksymu sodowego w 1 % i 5 % kropach w wersjach recepturowych i „przemysłowych", w dniu sporządzenia i w 30 dniu przechowywania, przedstawiono na rycinach 42 – 55 oraz w tabeli 48.

Krople recepturowe z cefuroksymem sodowym

Krople z cefuroksymem sodowym o stężeniu 1 % i 5% (w/w) zaprojektowano w czterech wersjach recepturowych. Skład kropli przedstawiono w tabeli 15. Uzasadnienie zaprogramowanego składu kropli w odniesieniu do zaplanowanych i przeprowadzonych badań fizykochemicznych przedstawiono w tabeli 16. Z punktu widzenia terapii, przy wyborze stężenia cefuroksymu w kroplach i składu kropli powinny być brane pod uwagę takie czynniki jak : stan zakażenia i jego intensywność, obszar oka zajęty zakażeniem oraz etap zakażenia. Krople 1 % i 5 % sporządzone według składu recepturowego formulacji nr 1 i nr I przeznaczone są do stosowania zwłaszcza w początkowym, ostrym etapie zakażenia, w którym nie wskazane jest stosowanie kropli zawierających środki konserwujące i zwiększające lepkość. Krople 1 % i 5 % formulacji nr 1 i nr I wskazane są również w leczeniu zakażeń u pacjentów z uszkodzonym nabłonkiem rogówki lub brakiem tolerancji oka na środki konserwujące. Krople 1 % i 5% zawierające środki konserwujące (formulacje nr 2 i nr II) są zalecane po opanowaniu ostrej fazy zakażenia, przy braku objawów uszkodzenia nabłonka rogówki oraz w przypadku dobrej tolerancji oka pacjenta na środki konserwujące. Zastosowanie kropli 1 % i 5 % z cefuroksymem sporządzonych w buforze cytrynianowym, zawierających poliwinyloalkohol zwiększający lepkość kropli i wydłużający czas kontaktu kropli z okiem (formulacje nr 3 i nr III) jest korzystne w przypadku konieczności zwiększania penetracji cefuroksymu przez rogówkę do przedniej komory oka. Krople formulacji nr 3 oraz nr III mogą być stosowane po opanowaniu ostrej fazy zakażenia oraz w przypadku braku tolerancji oka pacjenta na środki konserwujące. Krople 1 % i 5 % zawierające środki konserwujące i poliwinyloalkohol (formulacje nr 4 i nr IV) mogą być stosowane po opanowaniu ostrej fazy zakażenia, przy braku objawów uszkodzenia rogówki oraz w przypadku dobrej tolerancji oka na środki konserwujące.

Wszystkie zaproponowane formulacje sporządzono w warunkach aseptycznych, zgodnie z metodyką przedstawioną w punktach 7 i 8. Wszystkie wersje kropli zostały wykonane w dwóch seriach, a następnie przechowywane w chłodziarkach farmaceutycznych przez 30 dni, w temperaturze 4 ^{o}C i 20 ^{o}C. Podczas przechowywania dokonano oceny fizykochemicznej kropli, która obejmowała badania : pH, ciśnienia osmotycznego, barwy i klarowności oraz analizę zmiany zawartości cefuroksymu sodowego, za pomocą metody HPLC. W wersjach kropli 3 i 4 oraz III i IV zbadano również lepkość. Równolegle wykonano 1 % i 5 % (w/w) roztwory cefuroksymu

sodowego w wodzie jałowej, które stanowiły próby odniesienia w przeprowadzonej analizie fizykochemicznej.

pH świeżo sporządzonych 1 % (w/w) kropli wynosiło 6,23 – 6,27. W trakcie przechowywania w temperaturze 4 °C obserwowano niewielkie zmiany tych wartości, ponieważ po 30 dniu pH wynosiło 6,12 – 6,40, w zależności od wersji kropli. W temperaturze 20 °C zmiany te były bardziej widoczne, ale i w tym wypadku pH wzrosło w 30 dniu przechowywania maksymalnie do wartości 7,07, co według danych literaturowych stanowiło jeszcze optymalne pH dla trwałości antybiotyku [57]. W świeżo wykonanych kroplach 5 % (w/w) pH wynosiło 6,15 – 6,28, natomiast po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4 °C wzrosło do wartości 7,18 – 7,83, a w przypadku temperatury 20 °C osiągnęło wartość 8,24 – 8,83. Większe zmiany pH, w porównaniu do 1 % kropli, można tłumaczyć innym składem ilościowym buforów przeznaczonych do wykonania 5 % kropli a nie stężeniem antybiotyku, o czym świadczą równolegle prowadzone badania pH w roztworach wodnych cefuroksymu sodowego. pH świeżo sporządzonych 1 % roztworów wodnych wynosiło 7,41. Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C wzrosło do wartości 7,86, a w temperaturze 20 °C do wartości 8,22. Na podobnym poziomie przebiegały zmiany pH w 5 % roztworach wodnych, gdzie świeżo sporządzone roztwory charakteryzowały się pH równym 8,03 , które wzrosło po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C do wartości 8,41, a w temperaturze 20 °C do wartości 8,66. Porównując procentowy wzrost wartości, jaki nastąpił w roztworach wodnych w trakcie ich przechowywania w temperaturze 4 °C zaobserwowano, że w 1 % roztworach wodnych cefuroksymu sodowego pH w 30 dniu przechowywania wzrosło o 6,07 %, podczas gdy w 5 % roztworach przechowywanych w tych samych warunkach pH wzrosło o 4,73 %. W przypadku temperatury przechowywania 20 °C wystąpiła ta sama prawidłowość, gdzie w 1 % roztworach wodnych cefuroksymu w 30 dniu przechowywania nastąpił wzrost wartości o 10,93 %, natomiast w 5% roztworach wodnych antybiotyku o 7,85 %, w odniesieniu do pH świeżo wykonanych roztworów. Szczegółowe wyniki analizy przedstawiono w tabelach 18 i 19 oraz na rycinach 13 – 18.

Ciśnienie osmotyczne 1% kropli do oczu w dniu sporządzenia wynosiło od 367 mOsm/L do 418 mOsm/L.W trakcie badań ciśnienie osmotyczne kropli stopniowo ulegało zmianie, która ściśle korelowała z temperaturą ich przechowywania. Po 30 dniach w kroplach 1 % przechowywanych w temperaturze 4 ° ciśnienie osmotyczne osiągnęło wartość od 364 mOsm/L do 432 mOsm/L, natomiast w kroplach przechowywanych w temperaturze 20 °C od 363 mOsm/L do 451 mOsm/L. W przypadku 5 % kropli ciśnienie osmotyczne w dniu ich wykonania wynosiło od 381 mOsm/L do 430 mOsm/L. W 30 dniu badań w temperaturze 4 °C wzrosło od 399 mOsm/L do 449 mOsm/L, w zależności od wersji. Podczas gdy w kroplach przechowywanych w temperaturze 20 °C ciśnienie osmotyczne w tym samym czasie osiągnęło wartość od 493 mOsm/L do 536 mOsm/L. Porównując zmiany ciśnienienia osmotycznego w odniesieniu do procentowego wzrostu lub spadku wartości jaki nastąpił w badanych kroplach po 30 dniach przechowywania, stwierdzono, że w temperaturze 4 °C zmiany w 1 % i 5% kroplach zachodziły na podobnym poziomie, z wyjątkiem wersji IR, gdzie zaobserwowano wzrost ciśnienia osmotycznego o 17,85 % w odniesieniu do wartości początkowej. W pozostałych wersjach kropli 5 % przechowywanych w temperaturze 4°C nastąpił wzrost ciśnienia osmotycznego od 0,93 % do 3,28 %, natomiast w 1% kroplach przechowywanych w identycznych warunkach, ciśnienie osmotyczne nieznacznie spadło lub wzrosło od 0,82 % do 5,21 %, w zależności od wersji recepturowej. W kroplach przechowywanych w temperaturze 20 °C różnice w zmianach fizycznych między kroplami 1 % a 5 % były bardziej widoczne, ponieważ w 1 % kroplach w wersji 1R nastąpił nieznaczny spadek ciśnienia osmotycznego, natomiast w pozostałych wersjach kropli ciśnienie osmotyczne wzrosło od 3,40 % do 11,20 %. W 5 % kroplach ciśnienie osmotyczne w zależności od wersji wzrosło od 24,65 % do 29,66 %. Na zmiany te nie miało wpływu stężenie antybiotyku w kroplach, z uwagi na fakt, że w równolegle prowadzonych badaniach ciśnienia osmotycznego w roztworach wodnych cefuroksymu sodowego, stanowiących próby odniesienia, nie zaobserwowano procentowo większego wzrostu wartości w 5 % roztworach wodnych, w porównaniu do 1% roztworów wodnych antybiotyku przechowywanych w temperaturze 4 °C. Ponadto zaobserwowano, że w roztworach wodnych cefuroksymu sodowego, zwłaszcza przechowywanych w temperaturze 20 °C następował szybki wzrost ciśnienia osmotycznego, które w 30 dniu badań w 1 % roztworach wzrosło o 57,45 %, natomiast w 5 % roztworach o 46,15 %, w odniesieniu do wartości początkowej. Ponadto ciśnienie osmotyczne jakie uzyskano w roztworach

wodnych cefuroksymu sodowego w dniu ich sporządzenia, które wynosiło dla 1 % roztworów 47 mOsm/L, a dla 5 % roztworów 221 mOsm/L dyskwalifikuje ich zastosowanie w miejscowym leczeniu infekcji oczu. Włączenie do składu 1% i 5% kropli buforów cytrynianowych zwiększyło stabilność fizyczną sporządzonych roztworów oraz umożliwiło uzyskanie wartości ciśnienia osmotycznego i pH, które są dobrze tolerowane przez oko.

Analogicznie jak w badaniach pH, kluczową rolę w zmianach wartości ciśnienia osmotycznego odegrała temperatura przechowywania kropli oraz zmodyfikowany skład buforów przeznaczonych do sporządzania 5 % kropli w wersji recepturowej. Wyniki badań ciśnienia osmotycznego, prowadzonych w odstępach trzydniowych przedstawiono w tabelach 22 – 23 oraz na rycinach 23 – 28.

Lepkość kropli oznaczono w wersjach 3R i 4R oraz IIIR i IVR w dniu sporządzenia i w 30 dniu ich przechowywania (tabela 26). Lepkość 1 % kropli w dniu wykonania wynosiła od 8,15 - 8,22 mPa•s. Po 30 dniach przechowywania w tempearturze 4 ^{o}C, zaobserowano niewielki spadek lepkości do wartości 8,02 – 8,10 mPa•s, natomiast w wersjach przechowywanych w temperaturze 20 ^{o}C nastąpił spadek lepkości do wartości 7,72 – 7,76 mPa•s. Podobne zmiany zaobserowano w kroplach 5%, gdzie w dniu sporządznia kropli lepkość wynosiła 8,28 – 8,46 mPa•s, natomiast po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4^{o}C lepkość zmalała do wartości 8.12 – 8.33 mPa•s, a w 20 ^{o}C do wartości 7,80 – 7,96 mPa•s.

Ocena oragnoleptyczna. W ramach badań organoleptycznych oceniono zmianę zabarwienia, klarowność oraz zapach kropli (tabela 29). W dniu sporządzenia wszystkie wersje kropli 1% były bezbarwne. W trakcie przechowywania w tempearturze 4 ^{o}C krople nabrały barwy słomkowej, natomiast w temperaturze 20 ^{o}C, z uwagi na inntensywniej przebiegające procesy rozkładu antybiotyku, krople stopniowo żółkły. Krople 5 % w dniu sporządzenia miały kolor słomkowy, który w tempearturze 4^{o}C w trakcie przechowywania zmienił się na jasnożółty, natomiast w przypadku kropli przechowywanych w temperaturze 20 ^{o}C kolor uległ zmianie z słomkowego na bursztynowy. Analogiczne zmiany zaobserwowano w roztworach wodnych antybiotyku. Wszystkie wersje roztworów wodnych cefuroksymu sodowego oraz kropli do oczu pozostały klarowne podczas przechowywania. Wszystkie wersje kropli konserwowanych miały charakterystyczny zapach pochodzący od alkoholu

β-fenyloetylowego. Wersje niekonserwowane charakteryzowały się zapachem antybiotyku.

Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w roztworach wodnych i kroplach. Trwałość cefuroksymu w buforowanych kroplach do oczu oraz roztworach wodnych antybiotyku, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C, określono metodą HPLC jako czas po którym ponad 10 % cefuroksymu sodowego ulegnie rozkładowi, w odniesieniu do wartości początkowej. Czynnikiem decydującym o trwałości cefuroksymu w buforowanych kroplach była przede wszystkim temperatura przechowywania kropli. Temperatura 20 °C nie nadawała się do przechowywania kropli i roztworów niebuforowanych z cefuroksymem sodowym, z uwagi na szybki rozkład antybiotyku w tych warunkach. Ponad 10 % spadek zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % i 5 % buforowanych kroplach oraz roztworach niebuforowanych następował maksymalnie po upływie 3 dni. Trwałość cefuroksymu w 1 % kroplach buforowanych (formulacja nr 1R) oraz buforowanych i konserwowanych (formulacja nr 2R), przechowywanych w temperaturze 4 °C wynosiła 15 dni. W analogicznych wersjach kropli 5 % przechowywanych w tych samych warunkach trwałość cefuroksymu sodowego wynosiła odpowiednio: 21 dni (formulacja nr IR) oraz 15 dni (formulacja nr IIR). Poliwinyloalkohol zwiększał trwałość cefuroksymu w buforowanych 1 % i 5 % kroplach, przy czym stabilizujący wpływ poliwinyloalkoholu szczególnie wyraźnie zaznaczył się w przypadku 5 % kropli. Czas po którym ponad 10 % cefuroksymu uległo rozkładowi w buforowanych 1 % kroplach z zwiększoną lepkością (formulacje nr 3R i nr 4R), przechowanych w temperaturze 4 °C wynosił 18 dni, natomiast w buforowanych 5 % kroplach ze zwiększoną lepkością (formulacje nr IIIR i nr IVR), przechowywanych w tych samych warunkach, okres ten uległ wydłużeniu do 30 dni. Różnice w trwałości pomiędzy 1 % i 5 % kroplami przechowywanymi w 4 °C mogły wynikać z różnego składu ilościowego zastosowanych buforów. Nie stwierdzono wpływu stężenia antybiotyku na trwałość kropli, z uwagi na to, że w równolegle prowadzonych badaniach zmiany zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % i 5 % roztworach, sporządzonych w jałowej wodzie (formulacja nr $0_{1\%}$ i nr $0_{5\%}$) i przechowywanych w temperaturze 4 °C, 10 % rozkład cefalosporyny nastąpił po 27 dniu przechowywania. Szczegółowe wyniki badań zmiany zawartości cefuroksymu sodowego w roztworach wodnych i kroplach recepturowych przedstawiono w tabelach 49 – 58 i na rycinach 56 – 59 oraz w zbiorczej tabeli 68.

Tabela 68. Trwałość kropli wyrażona w dniach, w których utrzymywała się jeszcze 90 % zawartość cefuroksymu sodowego w odniesieniu do dnia ich wykonania.

Krople	**Dzień po którym następował ponad 10 % spadek zawartości cefuroksymu sodowego w badanych kroplach przechowywanych w temperaturze 4 °C**			
	Krople 1 %		**Krople 5 %**	
	Wersja kropli	**Dzień**	**Wersja kropli**	**Dzień**
Krople recepturowe	**$0_{1\%}$**	**27**	**$0_{5\%}$**	**27**
	1R	**15**	**IR**	**21**
	2R	**15**	**IIR**	**15**
	3R	**18**	**IIIR**	**30**
	4R	**18**	**IVR**	**30**
Krople „przemysłowe" w wersjach P0	**1P0**	**24**	**IP0**	**24**
	2P0	**24**	**IIP0**	**24**
	3P0	**30**	**IIIP0**	**30**
	4P0	**30**	**IVP0**	**27**
Krople „przemysłowe" w wersjach P6	**1P6**	**18**	**IP6**	**21**
	2P6	**18**	**IIP6**	**18**
	3P6	**21**	**IIIP6**	**24**
	4P6	**18**	**IVP6**	**21**

***<u>Właściwości fizykochemiczne roztworów wodnych cefuroksymu sodowego i buforowanych kropli do oczu</u>*.**

Pomimo stosunkowo dużej trwałości chemicznej 1 % i 5 % roztworów wodnych cefuroksymu sodowego przechowywanych w temperaturze 4 °C, nie jest korzystne zastosowanie tej postaci w terapii miejscowego leczenia infekcji oczu. O ile pH świeżo sporządzonych, jak i przechowanych w temperaturze 4 °C roztworów wodnych cefuroksymu sodowego może być dobrze tolerowane przez oko, tak ciśnienie osmotyczne niebuforowanych kropli jest zbyt niskie. Wszystkie miejscowo stosowane krople do oczu powinny być izotoniczne lub hipertoniczne i takie założenie spełniały zaprojektowane wersje recepturowych buforowanych 1 % i 5% kropli do oczu cefuroksymem sodowym. Trwałość buforowanych kropli przechowywanych w temperaturze 4 °C wynosiła od 15 do 30 dni i był to okres wystarczający do przeprowadzenia pełnej antybiotykoterapii w miejscowym leczeniu infekcji oczu.

Trwałość chemiczna a trwałość mikrobiologiczna cefuroksymu w 1% kroplach w wersji recepturowej. Produkty rozkładu antybiotyku.

Wcześniej prowadzone badania nad aktywnością przeciwdrobnoustrojową cefuroksymu w 1 % kroplach w wersjach recepturowych, którą wyznaczono za pomocą metody cylinderkowo-płytkowej według Farmakopei Polskiej VI z zastosowaniem szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P dowiodły, że krople przechowywane w temperaturze 4 °C charakteryzowały się po 30 dniach przechowywania 96,3 % aktywnością przeciwdrobnoustrojową w stosunku do dnia ich wykonania. W przypadku wersji kropli przechowywanych w temperaturze 20 °C stwierdzono, że dopiero po upływie 14 dni badań nastąpił ponad 10 % spadek aktywności przeciwdrobnoustrojowej cefuroksymu [68,72]. Badania te nie korelowały z wynikami analizy trwałości chemicznej cefuroksymu wyznaczonej metodą HPLC w analogicznych wersjach kropli, gdzie ponad 10 % spadek zawartości antybiotyku następował po 15 – 18 dniach przechowywania kropli w temperaturze 4 °C, podczas gdy w kroplach przechowywanych w temperaturze 20 °C, 90 % zawartość antybiotyku utrzymywała się maksymalnie do 3 dni. Różnice w przedstawionych badaniach mogły wynikać z mechanizmu rozkładu cefuroksymu sodowego w badanych kroplach.

Jak wynika z piśmiennictwa, w roztworach wodnych o pH powyżej 3,5 cefuroksym sodowy ulega hydrolizie, w wyniku której następuje odłączenie od jego cząsteczki bocznego łańcucha w pozycji 3, z utworzeniem descarbomylocefuroksymu z zachowanym ugrupowaniem β-laktamowym [58,59]. Podczas analizy chromatograficznej roztworu wodnego cefuroksymu sodowego, ogrzanego przez 10 min w temp. 60 ^{0}C stwierdzono, że pik powstałego produktu rozkładu pojawia się tuż przed pikiem analizowanego antybiotyku [59].

Zarówno w trakcie analizy trwałości cefuroksymu sodowego w sporządzonych roztworach wodnych i kroplach do oczu w ciągu 30 dni przechowywania, jak i podczas analizy roztworów antybiotyku w wodzie oraz buforach cytrynianowych o pH 3,8 i 6,5 poddanych temperaturze 60 ^{0}C w ciągu 10 min, na chromatogramach pojawił się pik głównego produktu rozkładu cefuroksymu przy czasie retencji t_R = 6.8 (ryciny 64 - 69). Analiza w UV widm pików wykazała, że cefuroksym (t_R= 8.6) i jego główny produkt rozpadu (t_R= 6.8) wykryty metodą HPLC charakteryzowały się analogicznymi widmami, z maksimum absorpcji przy długości fali 273 nm (rycina 70), co może potwierdzać zachowaną strukturę pierścienia β-laktamowego głównego

produktu rozkładu. Obecność w kroplach descarbomylocefuroksymu, może tłumaczyć różnicę pomiędzy trwałością cefuroksymu w 1 % kroplach, wyznaczoną metodą HPLC a aktywnością przeciwdrobnoustrojową antybiotyku. Wyniki aktywności przeciwdrobnoustrojowej cefuroksymu w 1 % kroplach mogą sugerować, że descarbomylocefuroksym w kroplach, dzięki zachowanej strukturze ugrupowania β-laktamowego, może wykazywać aktywność przeciwdrobnoustrojową.

W celach porównawczych równolegle przeprowadzono analizę HPLC 1 % i 5 % roztworów cefuroksymu w 0,1 mol/L roztworze NaOH oraz w 1 % roztworze trietyloaminy (punkt nr 12). Badanie to miało na celu określenie wpływu zasadowego pH i reakcji aminolizy na trwałość antybiotyku. Okazało się, że w środowisku zasadowym i w obecności aminy nastąpił szybki rozkład cefuroksymu, od razu po jego rozpuszczeniu (ryciny 71 – 74, tabela 67). Na chromatogramach pojawiło się obok cefuroksymu szereg pików pochodzących od produktów rozkładu antybiotyku. W odróżnieniu od mechanizmu rozkładu cefuroksymu w roztworach o pH obojętnym i kwaśnym stwierdzono, że na wszystkich chromatogramach za pikiem antybiotyku przy czasie retencji t_R = 11,3, pojawia się wyraźny pik głównego produkt rozkładu, o maksimum absorpcji przy długości fali 267 nm.

***„Przemysłowe" wersje kropli z cefuroksymem sodowym*.**

Z uwagi na brak na rynku farmaceutycznym handlowej postaci kropli do oczu z cefuroksymem sodowym, w niniejszych badaniach zaproponowano postać kropli w dwuzbiornikowym opakowaniu. Badania trwałości cefuroksymu w kroplach recepturowych metodą HPLC wykazały, że w wyniku szybko przebiegającego procesu hydrolizy antybiotyku, wskazane jest opracowanie handlowej postaci pod warunkiem zastosowania opakowania składającego się z dwóch komór, gdzie w jednym zbiorniku będzie znajdowała się liofilizowana postać cefuroksymu sodowego, natomiast w drugim zbiorniku wyjałowiony rozpuszczalnik. Połączenie cefalosporyny z rozpuszczalnikiem następowałoby bezpośrednio przed użyciem kropli przez pacjenta. Z uwagi na niską trwałość cefuroksymu w kroplach recepturowych przechowywanych w temperaturze 20 °C oraz fakt, że taką temperaturę wprowadzono tylko w celu wykazania różnic w szybkości zmian fizykochemicznych jakie przebiegały w kroplach w trakcie przechowywania w ciągu 30 dni analizy, w dalszym etapie badań krople w wersji „przemysłowej" przechowywano tylko w temperaturze 4 °C.

Rozpuszczalniki przeznaczone do kropli w wersji „przemysłowej”.

W oparciu o zadawalające wyniki trwałości chemicznej cefuroksymu, jakie uzyskano w wszystkich wersjach recepturowych kropli przechowywanych w temperaturze 4 °C, zaprojektowano skład rozpuszczalników do wersji „przemysłowych” kropli, który przedstawiono w tabeli nr 7. Rozpuszczalniki sporządzono według procedury opisanej w punktach nr 4 i nr 6.2. W celu oceny trwałości rozpuszczalników oraz wpływu ewentualnych zmian fizycznych zachodzących w rozpuszczalnikach, na stabilność cefuroksymu w sporządzonych kroplach w wersjach „przemysłowych”, kierowano się wytycznymi ICH Q1A(R2) [74]. Świeżo wykonane i wyjałowione rozpuszczalniki poddano ocenie fizycznej, która obejmowała pomiar pH, ciśnienia osmotycznego, wyglądu oraz w przypadku wersji o modyfikowanej lepkości dodatkowo wykonano pomiar lepkości. Następnie rozpuszczalniki umieszczono w komorach klimatycznych i przechowywano przez okres 6 miesięcy w temperaturze 40 °C, przy wilgotności względnej 75 % RH ± 5% RH oraz przez okres 12 miesięcy w temperaturze 25 °C przy wilgotności względnej 60 % RH ± 5% RH. Test długoterminowy prowadzony w temperaturze 25 °C miał na celu wyznaczenie terminu ważności rozpuszczalników, natomiast test prowadzony w warunkach przyspieszonego starzenia w temperaturze 40 °C miał dać odpowiedź, czy ekspozycja rozpuszczalników na wyższą temperaturę, na przykład podczas transportu, może powodować zmiany fizyczne w rozpuszczalnikach i w jakim stopniu te zmiany mogą mieć wpływ na trwałość cefuroksymu w sporządzonych kroplach, otrzymanych poprzez połączenie liofilizowanej postaci antybiotyku z jałowym rozpuszczalnikiem.

Ocena fizyczna i mikrobiologiczna rozpuszczalników podczas długoterminowego testu stabilności.

Podczas przechowywania rozpuszczalników w komorze klimatycznej, przez okres 12 miesięcy w temperaturze 25 °C ± 2 °C przy wilgotności względnej 60 % RH ± 5% RH, dokonano w odstępach trzymiesięcznych oceny fizycznej, która obejmowała analogiczne badania jakie przeprowadzono w świeżych rozpuszczalnikach po ich wyjałowieniu. Szczegółową ocenę przedstawiono w tabelach 8 i 9. W trakcie przechowywania rozpuszczalników w okresie 12-stu miesięcy w temperaturze 25 °C ± 2 °C zaobserwowano niewielkie zmiany. Wartości pH świeżo wykonanych i wyjałowionych rozpuszczalników mieściły się w zakresie 6,13 – 6,26 dla wersji przeznaczonych do wykonania 1 % kropli oraz 6,08 – 6,40 dla wersji przeznaczonych

do wykonania 5 % kropli. Po roku przechowywania w temperaturze 25 ºC ± 2 °C, pH rozpuszczalników przeznaczonych dla 1 % kropli wynosiło 5,95 – 6,18, natomiast pH rozpuszczalników przeznaczonych dla 5 % kropli zmalało do wartości 5,91 – 6,29. Ciśnienie osmotyczne świeżo wykonanych rozpuszczalników dla 1 % kropli wynosiło od 300 do 367 mOsm/L, w zależności od wersji i wzrosło w trakcie rocznego przechowywania do wartości 311 – 380 mOsm/L. Analogicznie w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 5 % kropli, w trakcie 12 miesięcy przechowywania w temperaturze 25 ºC ± 2 °C obserwowano wzrost ciśnienia osmotycznego z wartości 159 – 224 mOsm/L do wartości 161 – 230 mOsm/L, w zależności od wersji rozpuszczalnika. Lepkość rozpuszczalników świeżo sporządzonych, zmierzona po procesie wyjaławiania wynosiła: 7,88 i 7,47 mPa • s (dla wersji 3 i 4) oraz 8,24 i 8,03 mPa • s (dla wersji III i IV). W trakcie długoterminowego testu stabilności obserwowano zmianę lepkości, która intensywniej przebiegała w wersjach rozpuszczalników przeznaczonych dla 1 % kropli, gdzie po 12 miesiącach przechowywania nastąpił wzrost jej wartości do 8,79 i 8,53 mPa • s (odpowiednio dla wersji 3 i 4), podczas gdy w wersjach rozpuszczalników III i IV lepkość zaledwie wzrosła do wartości 8,48 i 8,20 mPa • s. Biorąc pod uwagę fakt, że wszystkie wersje rozpuszczalników o zmodyfikowanej lepkości były przechowywane w tym samym czasie i w identycznych warunkach, procentowo większy wzrost lepkości w wersjach oznaczonych cyframi arabskimi mógł być przypuszczalnie spowodowany interakcją pomiędzy składnikami buforu cytrynianowego a alkoholem poliwinylowym. W wersjach rozpuszczalników oznaczonych cyframi rzymskimi, przeznaczonych do sporządzania 5 % kropli, zastosowano identyczne proporcje buforu cytrynianowego do alkoholu poliwinylowego jak wersjach rozpuszczalników przeznaczonych dla 1% kropli, z tą różnicą, że zawartość kwasu cytrynowego i cytrynianu sodu była dwukrotnie niższa w wersjach III i IV, co mogłoby tłumaczyć mniejszy wzrost lepkości w tych roztworach, jaki nastąpił w trakcie ich przechowywania w ciągu 12 miesięcy, w porównaniu do wersji 3 i 4 rozpuszczalników. W odstępach trzymiesięcznych prowadzono również ocenę organoleptyczną, która nie wykazała żadnych zmian zabarwienia, czy też utraty klarowności rozpuszczalników podczas 12 miesięcy przechowywania w temperaturze 25 ºC ± 2 °C . W wszystkich wersjach konserwowanych rozpuszczalników utrzymywał się charakterystyczny zapach pochodzący od alkoholu β-fenyloetylowego.

W ramach oceny jakościowej rozpuszczalników, zawierających w swoim składzie środki konserwujące (wersje: nr 2 i nr II oraz nr 4 i nr IV), po 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 25 °C ± 2° C / 60 % RH ± 5% RH , przeprowadzono test skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej, którego szczegółowe wyniki przedstawiono w tabelach 12 i 13. Stopień redukcji komórek wszystkich farmakopealnych drobnoustrojów testowych był zgodny z wymogami Farmakopei Polskiej VII. Ponadto boran fenylortęciowy i alkohol β – fenyloetylowy wykazywały dużą skuteczność przeciwdrobnoustrojową wobec szczepu testowego *Listeria monocytogenes*, nie ujętego w monografii testu konserwacji Farmakopei Polskiej VII. Nie udało się natomiast uzyskać 100 % redukcji komórek szczepów testowych *Bacillus cereus*, która w 28 dniu badań wynosiła 99,99 %.

Niewielkie zmiany fizyczne w badanych próbach, w trakcie roku prowadzenia testu długoterminowego oraz przeprowadzona ocena mikrobiologiczna, wskazywały na to, że temperatura do 25 °C ± 2°C będzie optymalna do przechowywania rozpuszczalników przeznaczonych do sporządzania wersji przemysłowych kropli z cefuroksymem sodowym.

Ocena fizyczna rozpuszczalników podczas testu stabilności w warunkach przyspieszonego starzenia.

Analogicznie jak w teście stabilności długoterminowym, podczas przechowywania rozpuszczalników przez okres 6 miesięcy w temperaturze 40 °C ± 2 °C, przy wilgotności względnej 75 % RH ± 5% RH, prowadzono ocenę jakościową w odstępach trzymiesięcznych. Szczegółowe wyniki analizy przedstawiono w tabeli 10. W trakcie 6-cio miesięcznych badań nastąpił spadek pH rozpuszczalników z wartości 6,13 – 6,26 do 5,87 – 6,12 dla wersji oznaczonych cyframi arabskimi oraz spadek wartości pH z 6,08 – 6,40 do 5,75 – 6,29 dla wersji rozpuszczalników oznaczonych cyframi rzymskimi. Równocześnie zaobserwowano wzrost ciśnienia osmotycznego rozpuszczalników, które po 6 miesiącach przechowywania wynosiło 306 – 388 mOsm/L dla wersji rozpuszczalników przeznaczonych dla 1 % kropli oraz 162 – 249 mOsm/L dla wersji przeznaczonych dla 5 % kropli. W wszystkich rozpuszczalnikach zawierających w swoim składzie alkohol poliwinylowy nastąpił wzrost lepkości, który najbardziej zaznaczył się w wersjach 3 i 4 przeznaczonych dla 1 % kropli. W ciągu 6 miesięcy przechowywania, lepkość w tych wersjach wzrosła z wartości 7,47 – 7,88 mPa • s do 8,46 – 8,68 mPa • s, natomiast w wersjach rozpuszczalników III i IV

przeznaczonych dla 5 % kropli, lepkość w tym samym czasie wzrosła z wartości z 8,03 – 8,24 mPa • s do 8,39 – 8,50 mPa • s.

Analogicznie jak podczas długoterminowego testu stabilności nie stwierdzono zmiany zabarwienia oraz klarowności badanych rozpuszczalników i podobnie w wersjach konserwowanych w trakcie całego cyklu przechowywania utrzymywał się charakterystyczny zapach alkoholu β-fenyloetylowego.

Porównanie wyników badań stabilności rozpuszczalników uzyskanych testem długoterminowym oraz w warunkach przyspieszonego starzenia.

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzały pewną prawidłowość w zmianach fizycznych, jakie przebiegały w rozpuszczalnikach poddanych zarówno testowi długoterminowemu oraz testowi w warunkach przyspieszonego starzenia, ponieważ zaobserwowano wzrost ciśnienia osmotycznego i lepkości oraz spadek pH rozpuszczalników w trakcie prowadzonych badań. Zmiany te były nieznaczne i ściśle skorelowane z temperaturą przechowywania rozpuszczalników, o czym świadczy procentowy wzrost lub spadek mierzonych wartości ,w odniesieniu do oceny jakościowej przeprowadzonej w świeżo sporządzonych i wyjałowionych rozpuszczalnikach. Po 6 miesiącach przechowywania rozpuszczalników w temperaturze 40 °C nastąpił spadek wartości pH od 1,57 % do 6,05 % w zależności od wersji, podczas gdy w 12-stym miesiącu przechowywania rozpuszczalników w temperaturze 25 °C zaobserwowano spadek pH od 1,13 % do 3,43 %, w stosunku do wartości uzyskanych w świeżych rozpuszczalnikach. Analogiczną prawidłowość wystąpiła w przypadku pomiaru ciśnienia osmotycznego, gdzie wyższy wzrost wartości uzyskano w trakcie testu stabilności prowadzonego w warunkach przyspieszonego starzenia, gdzie po półrocznym przechowywaniu rozpuszczalników ciśnienie osmotyczne wzrosło od 1,89 % do 11,98 %. Wyjątkiem tutaj była tylko wersja 2, gdzie nie stwierdzono zmiany w ciśnieniu osmotycznym, w odniesieniu do oceny jakościowej przeprowadzonej w świeżym rozpuszczalniku. W rozpuszczalnikach przechowywanych w temperaturze 25 °C nastąpiła jeszcze mniejsza zmiana ciśnienia osmotycznego, gdzie po 12 miesiącach nastąpił jego wzrost od 0,59 % do 3,67 %, z wyjątkiem wersji II, gdzie obserwowano spadek ciśnienia o około 1 %, w odniesieniu do wyników analizy przeprowadzonej w świeżym rozpuszczalniku. W przypadków pomiarów lepkości zaobserwowano, że największa zmiana wartości nastąpiła w wersjach 3 i 4 w obu prowadzonych testach stabilności, co mogło być spowodowane różnicą w składzie

ilościowym zastosowanych buforów cytrynianowych w rozpuszczalnikach oznaczonych cyframi arabskimi, w porównaniu do rozpuszczalników oznaczonych cyframi rzymskimi. W teście długoterminowym nastąpił wzrost lepkości w wersji 3 i 4 od 11,55 % do 14,19 %, natomiast w wersjach III i IV nastąpił wzrost lepkości od 2,12 % do 2,91 %. W teście przyśpieszonego starzenia w wersji 3 i 4 po 6 miesiącach przechowywania nastąpił wzrost lepkości od 10,15 % do 13,25 %, a wersjach III i IV od 1,82 % do 5,85 %.

Krople do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych" sporządzone na świeżo wykonanych rozpuszczalnikach.

W następnym etapie badań wykonano 1 % i 5 % (w/w) krople do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", zgodnie z metodyką opisaną w punkcie nr 9.2., według składu przytoczonego w tabeli 17. Krople wykonano na świeżo sporządzonych i wyjałowionych rozpuszczalnikach, których skład przedstawiono w tabeli 7. Sposób wykonania kropli polegał na bezpośrednim łączeniu w warunkach aseptycznych cefuroksymu sodowego z odpowiednią wersją wyjałowionego rozpuszczalnika, co miało odwzorowywać warunki, w których bezpośrednio przed użyciem pacjent przygotowuje krople poprzez wymieszanie zawartości dwukomorowego opakowania, gdzie w jednej komorze znajdowałby się wyjałowiony rozpuszczalnik, a w drugiej liofilizowana postać antybiotyku. W odróżnieniu od metodyki sporządzenia kropli recepturowych, pominięto tutaj etap sączenia mikrobiologicznego. Ponadto w wersjach o modyfikowanej lepkości uniknięto bezpośredniego łączenia antybiotyku z buforem cytrynianowym, co wykluczyło w dalszej fazie etap uzupełniania kropli do wymaganej masy alkoholem poliwinylowym. W przypadku kropli zawierających w swoim składzie alkohol β-fenyloetylowy oraz boran fenylortęciowy dodatkowo wyeliminowano osobny etap konserwowania. Z uwagi na bardzo dobrą rozpuszczalność cefuroksymu sodowego w sporządzonych rozpuszczalnikach i obraną metodykę sporządzania kropli, uległ skróceniu czas w jakim wykonano badaną postać leku. Wszystkie krople w wersjach „przemysłowych" sporządzono w dwóch seriach, a następnie przechowywano przez 30 dni w chłodziarkach farmaceutycznych w temperaturze 4 ^{o}C. W trakcie przechowywania, w odstępach trzydniowych, prowadzono identyczną jak w kroplach recepturowych ocenę fizykochemiczną, która obejmowała badania: pH, ciśnienia

osmotycznego, lepkości w przypadku wersji zawierających w swoim składzie alkohol poliwinylowy, ocenę organoleptyczną oraz zmianę zawartości cefuroksymu sodowego, metodą HPLC. Celem tego etapu badań było:

- określenie trwałości cefuroksymu sodowego w kroplach sporządzonych na świeżo wykonanych rozpuszczalnikach w wersjach „przemysłowych", która w późniejszym etapie miała stanowić punkt odniesienia do trwałości cefuroksymu sodowego w kroplach sporządzonych na rozpuszczalnikach, w których zaobserwowano największe zmiany fizyczne w trakcie przechowywania, podczas prowadzonych testów stabilności.
- porównanie trwałości cefuroksymu sodowego w kroplach sporządzonych na świeżych rozpuszczalnikach „przemysłowych", z trwałością kropli recepturowych podczas przechowywania w temperaturze 4 °C, co mogło dać odpowiedź czy przyjęta metoda wykonywania kropli może mieć istotny wpływ na ich trwałość.

pH 1 % kropli z cefuroksymem sodowym, sporządzonych na świeżo wykonanych rozpuszczalnikach „przemysłowych" (wersje kropli oznaczone symbolem P0), w pierwszym dniu badań wynosiło 6,17 – 6,29, w zależności od wersji. Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4 °C, pH praktycznie nie uległo zmianie, ponieważ uzyskano wyniki w przedziale 6,16 – 6,26. W przypadku świeżo sporządzonych 5 % kropli, zmierzone pH mieściło się w zakresie 6,16 – 6,47, a w 30 dniu badań wynosiło 6,41 – 7,08 . Szczegółowe wyniki przeprowadzonej analizy przedstawiono w tabeli 20 oraz na rycinach 19 i 20.

Ciśnienie osmotyczne świeżo sporządzonych 1 % kropli (wersje oznaczone symbolem P0) wynosiło 341 – 409 mOsm/L. W trakcie przechowywania zaobserwowano wzrost ciśnienia osmotycznego do wartości 350 – 431 mOsm/L, w 30 dniu badań. W 5 % kroplach (P0) w dniu wykonania, w zależności od wersji, ciśnienie osmotyczne wynosiło 352 – 416 mOsm/L. Analogicznie jak w kroplach 1 %, nastąpił stopniowy wzrost ciśnienia osmotycznego, gdzie w 30 dniu badań uzyskano wartości 360 – 441 mOsm/L. Szczegółową ocenę jakościową przedstawiono w tabeli 24 oraz na rycinach 29 i 30.

Lepkość kropli w wersjach 3P0 i 4P0, w dniu wykonania wynosiła odpowiednio 8,02 mPa • s i 7,81 mPa • s. Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4 °C, lepkość praktycznie nie uległa zmianie. Tą samą prawidłowość zaobserwowano

w 5 % kroplach, których lepkość w dniu wykonania wynosiła dla wersji IIIP0 – 9,28 mPa • s, natomiast dla wersji IVP0 – 8,92 mPa • s. Wyniki pomiarów zestawiono w tabeli 27.

Ocena organoleptyczna. W dniu sporządzenia wszystkie wersje 1% kropli były bezbarwne. W trakcie przechowywania w tempearturze 4 °C krople nabrały barwy słomkowej. Krople 5 % w dniu sporządzenia miały kolor słomkowy, który w podczas przechowywania zmienił się na jasnożółty. Wszystkie krople w trakcie 30 dni badań pozostały klarowne. Wersje konserwowane miały charakterystyczny zapach pochodzący od alkoholu β-fenyloetylowego, natomiast wersje niekonserwowane kropli charakteryzowały się zapachem antybiotyku. Szczegółowe wyniki oceny organoleptycznej przedstawiono w tabeli 30.

Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego. Trwałość cefuroksymu w buforowanych kroplach do oczu przechowywanych w temperaturze 4 °C, które zostały wykonane na świeżo sporządzonych rozpuszczalnikach „przemysłowych", określono metodą HPLC. Trwałość chemiczną antybiotyku zdefiniowano jako czas po którym ponad 10 % cefuroksymu sodowego ulegnie rozkładowi w badanych kroplach, w odniesieniu do wartości początkowej. W wszystkich wersjach 1 % i 5% kropli do oczu z cefuroksymem sodowym uzyskano trwałość pozwalającą pacjentowi na przeprowadzenie pełnej terapii przy użyciu jednego opakowania. Trwałość 1 % i 5 % buforowanych kropli (formulacja nr 1P0 oraz nr IP0) oraz buforowanych kropli zawierających w swoim składzie środki konserwujące (formulacja nr 2P0 oraz nr II P0) wynosiła 24 dni. Trwałość 1 % i 5 % buforowanych kropli o modyfikowanej lepkości (formulacja nr 3P0 oraz III P0) oraz 1 % kropli konserwowanych o modyfikowanej lepkości (formulacja 4P0) wynosiła 30 dni. Podczas gdy w kroplach 5 % konserwowanych o modyfikowanej lepkości (formulacja IVP), 10 % spadek zawartości cefuroksymu sodowego nastąpił po 27 dniu ich przechowywania w temperaturze 4 °C. Szczegółowe wyniki analizy przedstawiono w tabelach 59 – 62, na rycinach 60 i 61 oraz w tabeli zbiorczej 68.

Trwałość kropli recepturowych a trwałość kropli w wersjach „przemysłowych”, wykonanych na świeżo sporządzonych rozpuszczalnikach.

Wszystkie zaproponowane wersje kropli recepturowych i „przemysłowych” z cefuroksymem sodowym spełniały założenia przytoczone w celu pracy. Otrzymano krople, które pod względem właściwości fizycznych: pH, ciśnienia osmotycznego i lepkości mogą być dobrze tolerowane przez oko. Zmiany fizykochemiczne, jakie zaobserwowano podczas prowadzonej oceny jakościowej w ciągu 30 dni przechowywania w temperaturze 4 °C, były niewielkie i nie wykraczały poza przyjęte normy dla kropli do oczu określone w Farmakopei Polskiej V [81]. Zarówno w 5 % kroplach recepturowych, jak i w kroplach „przemysłowych” o tym samym stężeniu, zmiany pH w trakcie przechowywania były większe niż w analogicznych wersjach 1% kropli, co mogło wynikać z różnic w składzie ilościowym zastosowanych buforów. W przeliczeniu na procentowe zmiany pH jakie zaszły po 30 dniach przechowywania kropli w temperaturze 4 °C, w odniesieniu do pomiarów przeprowadzonych w dniu ich sporządzenia, zaobserwowano następujące prawidłowości:

- zmiany pH 1 % kropli, sporządzonych na świeżo wykonanych rozpuszczalnikach do wersji „przemysłowych”, były mniejsze niż 1% , podczas gdy w analogicznych wersjach 1% kropli recepturowych zmiany były większe niż 1 %, z wyjątkiem wersji 1R
- w 5% kroplach w wersjach „przemysłowych” (P0) pH wzrosło od 4,06 % do 10,11 %, natomiast w 5 % kroplach recepturowych nastąpił wzrost pH od 14,33 % do 25,08 %

Z uwagi na wyższe stężenie antybiotyku i inny skład rozpuszczalników przeznaczonych do sporządzania 5 % kropli, zmiany w wartościach pH w trakcie 30 dni badań pozwalały na ich odniesienie do trwałości chemicznej cefuroksymu w badanych kroplach. W 5 % recepturowych kroplach o modyfikowanej lepkości nastąpił wzrost wartości pH o 14,33 % w wersji IIIR i o 15,87 % w wersji IVR, natomiast w pozostałych wersjach kropli IR i IIR, pH wzrosło odpowiednio o 19,51 % i 25,08 %. Wyższe zmiany pH w kroplach o niemodyfikowanej lepkości ściśle korelowały z krótszą trwałością cefuroksymu, gdzie w wersjach IR i IIR 10 % spadek zawartości antybiotyku nastąpił po 15 – 21 dniach, natomiast w wersjach IIIR i IVR trwałość cefuroksymu wynosiła 30 dni. Podobnie zmiana pH w 5 % kroplach „przemysłowych” o modyfikowanej lepkości (IIIP0 i IV P0) wynosząca odpowiednio 4,06 % i 4,36 %,

ściśle korelowała z dłuższą trwałością chemiczną antybiotyku w tych wersjach, w porównaniu do kropli IP0 i II P0, gdzie pH wzrosło odpowiednio o 8,35 % i 10,11 %.

W wszystkich kroplach recepturowych oraz w kroplach sporządzonych na świeżo wykonanych rozpuszczalnikach zaobserwowano stopniowy, niewielki wzrost ciśnienia osmotycznego podczas ich przechowywania w temperaturze 4°C, z wyjątkiem wersji kropli IR, gdzie ciśnienie wzrosło po 30 dniach badań o 17,85 % w odniesieniu do wartości początkowej oraz wersji 1R, gdzie w tym samym czasie nastąpił spadek wartości ciśnienia osmotycznego o 0,82 %. W pozostałych trzech wersjach 1 % kropli recepturowych nastąpił wzrost ciśnienia osmotycznego od 1,05 % do 5,21 %, natomiast w kroplach o tym samym stężeniu wykonanych na rozpuszczalnikach „przemysłowych" ciśnienie osmotyczne wzrosło od 1,59 % do 5,38 %. W 5% kroplach recepturowych ciśnienie osmotyczne po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C wzrosło od 0,93 % do 3,28 % (z wyjątkiem wersji IR), podczas gdy w kroplach „przemysłowych" wykonanych na świeżo sporządzonych rozpuszczalnikach i przechowywanych w tych samych warunkach, nastąpił wzrost ciśnienia osmotycznego od 2,27 % do 6,94 %.

Porównując trwałość chemiczną cefuroksymu sodowego w sporządzonych kroplach do oczu, definiowaną jako dzień w którym doszło do maksymalnie 10 % spadku zawartości antybiotyku, zaobserwowano następujące prawidłowości:

- w 1 % kroplach wykonanych na świeżo sporządzonych rozpuszczalnikach „przemysłowych" trwałość cefuroksymu sodowego była dłuższa o 9-12 dni w zależności od wersji, w porównaniu do 1% kropli recepturowych przechowywanych w tej samej temperaturze.
- w 5 % kroplach „przemysłowych" o niemodyfikowanej lepkości (wersje IP0 i II P0) uzyskano wyższą trwałość o 3 - 9 dni, w porównaniu do analogicznych wersji kropli recepturowych o tym samym stężeniu antybiotyku.
- w 5 % kroplach o modyfikowanej lepkości zarówno w wersjach recepturowych, jak i „przemysłowych" (III R i IVR oraz IIIP0) uzyskano identyczną trwałość cefuroksymu sodowego wynoszącą 30 dni, natomiast w wersji IVP0 trwałość antybiotyku wynosiła 27 dni.

Krople do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych" sporządzone na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej procesowi przyspieszonego starzenia

W dalszym etapie badań wykonano 1 % i 5 % (w/w) krople do oczu z cefuroksymem sodowym przy wykorzystaniu rozpuszczalników poddanych wcześniej procesowi przyspieszonego starzenia przez 6 miesięcy w temperaturze 40 °C, przy wilgotności względnej 75 % RH ± 5% RH. Celem tego etapu badań było zbadanie, czy zmiany jakie zaszły w rozpuszczalnikach, w trakcie ich półrocznego przechowywania w komorach klimatycznych, istotnie wpłynęły na trwałość cefuroksymu sodowego w sporządzonych kroplach przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4 °C. Wszystkie krople wykonano zgodnie z metodyką przedstawioną w punkcie nr 9.2., zgodnie ze składem przytoczonym w tabeli 17, czyli analogicznie jak wersje sporządzone na świeżych rozpuszczalnikach „przemysłowych". W ramach oceny jakościowej dokonano pomiarów: pH, ciśnienia osmotycznego, lepkości w wersjach kropli zawierających w swoim składzie alkohol poliwinylowy, oceny organoleptycznej oraz zmiany zawartości antybiotyku.

pH 1 % kropli z cefuroksymem sodowym, sporządzonych na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej procesowi przyspieszonego starzenia (krople oznaczone symbolem P6), w pierwszym dniu badań wynosiło 5,92 – 6,15, w zależności od wersji. Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4 °C pH kropli praktycznie nie uległo zmianie, ponieważ uzyskano wyniki w przedziale 5,90 – 6,24. W świeżo sporządzonych 5 % kroplach (P6) pH wynosiło 5,89 – 6,36, a w 30 dniu analizy 6,21 – 7,10, w zależności od wersji . Szczegółowe wyniki badań przedstawiono w tabeli 21 oraz na rycinach 21 i 22.

Ciśnienie osmotyczne świeżo sporządzonych 1 % kropli, wykonanych na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej procesowi przyspieszonego starzenia, wynosiło 347 – 427 mOsm/L. W trakcie przechowywania zaobserwowano wzrost ciśnienia osmotycznego do wartości 353 – 451 mOsm/L w 30 dniu badań. W świeżo wykonanych 5 % kroplach ciśnienie osmotyczne wynosiło 362 – 435 mOsm/L. W ciągu 30 dni analiz nastąpił stopniowy wzrost ciśnienia osmotycznego do wartości 374 – 475 mOsm/L. Szczegółową ocenę jakościową przedstawiono w tabeli 25 oraz na rycinach 31 i 32.

Lepkość 1% kropli w wersji 3P6 i 4P6 w dniu wykonania wynosiła odpowiednio 8,94 mPa • s i 8,68 mPa • s. Lepkość 5 % kropli w wersji IIIP6 w dniu sporządzenia wynosiła 9,69 mPa • s, natomiast wersji IVP6 9,52 mPa • s. Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4 ^{o}C zarówno w 1%, jak i w 5 % kroplach praktycznie nie zaobserwowano zmiany lepkości. Wyniki analizy przedstawiono w tabeli 28.

Ocena organoleptyczna. Barwa kropli i jej zmiana w trakcie przechowywania były identyczne jak w 1 % i 5% kroplach sporządzonych na świeżo wykonanych rozpuszczalnikach. Wszystkie krople były klarowne o zapachu antybiotyku, który w wersjach konserwowanych był maskowany zapachem alkoholu β – fenyloetylowego. Szczegółową ocenę jakościową przedstawiono w tabeli nr 30.

Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego. Trwałość chemiczna cefuroksymu sodowego, zbadana metodą HPLC i zdefiniowana jako czas po którym ponad 10 % cefuroksymu sodowego uległo rozkładowi w badanych kroplach, dla poszczególnych wersji przedstawiała się następująco:

- 18 dni dla 1 % kropli buforowanych, buforowanych konserwowanych i kropli konserwowanych o modyfikowanej lepkości (formulacja: nr 1P6, nr 2P6, nr 4P6), oraz w przypadku 5 % kropli w wersji buforowanej konserwowanej (formulacja nr IIP6).
- 21 dni dla 1 % kropli niekonserwowanych o modyfikowanej lepkości (wersja 3P6) oraz dla 5 % kropli buforowanych oraz konserwowanych o modyfikowanej lepkości (wersje IP6 oraz IVP6)
- 24 dni dla 5 % kropli niekonserwowanych o modyfikowanej lepkości (wersja IIIP6)

Zmiany zawartości cefuroksymu sodowego w kroplach przemysłowych w trakcie 30 dni badań zestawiono w tabelach 63 – 66, na rycinach 62 i 63 oraz w zbiorczej tabeli 68.

<u>Trwałość cefuroksymu w 1% i 5% (w/w) kroplach sporządzonych na świeżo wykonanych rozpuszczalnikach, a trwałość cefuroksymu w kroplach wykonanych na rozpuszczalnikach poddanych procesowi przyspieszonego starzenia</u>.

Na podstawie przeprowadzonych badań stabilności rozpuszczalników przeznaczonych do sporządzania kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych" stwierdzono, że kluczową rolę w ich trwałości fizycznej odgrywała temperatura przechowywania. W trakcie testu przyspieszonego starzenia prowadzonego przez 6 miesięcy w temperaturze 40 °C, przy wilgotności względnej 75 % RH ± 5 RH zaobserwowano większe zmiany fizyczne niż w tych samych seriach rozpuszczalników poddanych długotrwałemu procesowi starzenia, który trwał 12 miesięcy w temperaturze 25 °C przy wilgotności względnej 60 % RH ± 5RH, gdzie zaobserwowano niewielkie odchylenia od wartości początkowych. Pomimo, że deklarowaną temperaturą przechowywania rozpuszczalników jest temperatura do 25 °C, ponieważ gwarantuje ona ich stabilność przez minimum rok magazynowania, to celowe było zbadanie wpływu zmian jakie zaszły w rozpuszczalnikach w teście przyspieszonym, w temperaturze 40 °C, na trwałość cefuroksymu sodowego. Warunki te odzwierciedlały sytuację, w której mogłoby dojść do odchyleń od wymaganej temperatury przechowywania rozpuszczalników, na przykład na skutek niewłaściwych warunków transportu. Ponadto dawały odpowiedź, czy zmiany pH, ciśnienia osmotycznego oraz lepkości jakie zaszłyby w tych roztworach, mogłyby istotnie wpłynąć na jakość sporządzonych kropli. Porównując zmiany pH w kroplach sporządzonych na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej testowi przyspieszonego starzenia, ze zmianami pH jakie zaszły w kroplach sporządzonych na świeżych rozpuszczalnikach, zaobserwowano tą samą prawidłowość. W wszystkich wersjach kropli 1 % (P0 i P6) występował niewielki wzrost lub spadek pH, wynoszący maksymalnie około 1,46 % w wersji 1P6, w odniesieniu do wartości początkowej. Podczas gdy w kroplach 5 % zmiany pH były bardziej zauważalne, z uwagi na inny skład ilościowy zastosowanych buforów. W kroplach 5 % w wersjach P0 nastąpił wzrost pH od 4,06 % do 10,11%, podczas gdy w wersjach P6 pH wzrosło od 5,43 % do 11,87 % w 30 dniu badań. Podobną prawidłowość zaobserwowano w przypadku zmiany ciśnienia osmotycznego. W 1 % kroplach, w wersjach P0, ciśnienie osmotyczne wzrosło od 1,59 % do 5,38 %, podczas gdy w kroplach o tym samym stężeniu, w wersjach P6 nastąpił wzrost ciśnienia osmotycznego od 1,73 % do 5,97 %. W kroplach 5 % w wersjach P0, ciśnienie osmotyczne wzrosło od 2,27 % do 6,94 % , natomiast w wersjach P6 od 3,31 % do 9,95 %. Porównując poszczególne

wersje 5 % kropli przemysłowych stwierdzono, że wyższy procentowy wzrost pH i ciśnienia osmotycznego w wersjach P6, w porównaniu do analogicznych wersji kropli P0 o tym samym stężeniu, ściśle koreluje z niższą trwałością chemiczną cefuroksymu w kroplach sporządzonych na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej procesowi przyspieszonego starzenia, w porównaniu z trwałością chemiczną antybiotyku w kroplach wykonanych na świeżych rozpuszczalnikach.

Wszystkie sporządzone wersje kropli recepturowych oraz „przemysłowych" pod względem właściwości fizykochemicznych spełniały założenia celu pracy. Ciśnienie osmotyczne, pH i lepkość otrzymanych kropli mieściły się w zakresie tolerowanym prze oko ludzkie, a zmiany parametrów fizycznych jakie nastąpiły zarówno w kroplach podczas ich przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C, jak i w samych rozpuszczalnikach w trakcie testów stabilności, nie wpłynęły na jakość tej postaci leku. Różnice w trwałości chemicznej cefuroksymu, jakie uzyskano w poszczególnych wersjach kropli, z punktu widzenia antybiotykoterapii były mało istotne z uwagi na fakt, że 10 % spadek zawartości cefuroksymu sodowego nastąpił najwcześniej po 15 dniach przechowywania kropli 1 % i 5 % (wersje 1R, 2R oraz IIR) w temperaturze 4 ^{0}C.

VI. Wnioski

1. Wszystkie zaproponowane recepturowe i „przemysłowe” wersje kropli 1 % i 5% (w/w) z cefuroksymem sodowym, pod względem właściwości fizycznych oraz trwałości antybiotyku w kroplach, spełniały założenia celu pracy.
2. Substancje pomocnicze włączone do składu 1 % i 5 % recepturowych i „przemysłowych” kropli z cefuroksymem sodowym : kwas cytrynowy, cytrynian sodu, alkohol poliwinylowy, boran fenylortęciowy, alkohol β – fenyloetylowy nie wchodziły w interakcję farmaceutyczną z cefuroksymem i zagwarantowały kroplom właściwości fizyczne : pH, ciśnienie osmotyczne oraz lepkość zgodne z wymogami przytoczonymi w monografiach Farmakopei Polskiej V, Farmakopei Polskiej VIII oraz Farmakopei Europejskiej 6.
3. Uzasadnione było zastosowanie alkoholu poliwinylowego w składzie kropli 1 % i 5 % jako środka zwiększającego lepkość i wydłużającego czas kontaktu leku z okiem. Ponadto alkohol poliwinylowy zwiększał trwałość cefuroksymu w buforowanych kroplach, był trwały w kroplach, na co wskazywały minimalne zmieniające się wartości lepkości w przechowywanych kroplach i rozpuszczalnikach przeznaczonych do kropli „przemysłowych”.
4. Stosowanie do oczu roztworów wodnych cefuroksymu sodowego o stężeniu 1 % i 5% bez dodatku środków izotonicznych np. buforów cytrynianowych nie powinno mieć miejsca z uwagi na ich silną hipoosmotyczność w stosunku do płynu łzowego.
5. Skład i sposób sporządzania rozpuszczalników przeznaczonych do 1 % i 5 % kropli „przemysłowych” okazał się trafiony i uzasadniony. Właściwości fizyczne rozpuszczalników: pH, ciśnienie osmotyczne, lepkość oraz ich trwałość, określona testem przyśpieszonym i długoterminowym wg ICH oraz badaniem skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej, w przypadku wersji zawierających w swoim składzie środki konserwujące, uwarunkowały zgodność kropli „przemysłowych” z farmakopealnymi wymaganiami oraz założeniami przyjętymi w celu pracy.

6. Trwałość 1 % i 5 % kropli „przemysłowych” sporządzonych na świeżo sporządzonych rozpuszczalnikach, przechowywanych w temperaturze 4 ºC w zależności od ich składu wynosiła od 24 – 30 dni i była nieco wyższa od trwałości kropli recepturowych, wynoszącej 15 – 30 dni. Trwałość 1 % i 5 % kropli „przemysłowych” sporządzonych na rozpuszczalnikach poddanych procesowi przyspieszonego starzenia w czasie 6 miesięcy, w temperaturze 40 ºC ± 2 ºC i wilgotności względnej 75 % ± 5 % wynosiła 18 – 24 dni i była zgodna założeniami celu pracy.
7. Z przeprowadzonych badań wynikało, że krótkotrwała ekspozycja rozpuszczalników na temperaturę wyższą niż deklarowana temperatura przechowywania, wynosząca 25 ºC ± 2 ºC, nie powinna w sposób istotny negatywnie wpłynąć na właściwości fizyczne kropli oraz trwałość cefuroksymu w kroplach.
8. Różnice w trwałości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach recepturowych, wyznaczonej wcześniej na podstawie aktywności przeciwdrobnoustrojowej [68], która utrzymywała się na 99,63 % początkowym poziomie po 30 dniach przechowywania kropli w temperaturze 4 ºC, możnaby tłumaczyć pojawieniem się descarbomylocefuroksymu [59], głównego produktu rozkładu cefuroksymu, który dzięki zachowanej strukturze ugrupowania β – laktamowego w cząsteczce cefuroksymu może wykazywać w kroplach przeciwdrobnoustrojową aktywność.
9. Decydujący wpływ na trwałość cefuroksymu sodowego w 1 % i 5 % (w/w) kroplach do oczu miała temperatura przechowywania, dlatego krople recepturowe oraz „przemysłowe”, po połączeniu cefuroksymu z rozpuszczalnikiem, powinny być chronione przed światłem i przechowywane w temperaturze 4 ºC. Stężenie cefuroksymu sodowego nie miało wpływu na trwałość kropli, co udowodniła analiza prób odniesienia, którą stanowiły roztwory antybiotyku w wodzie do iniekcji.
10. Zwalidowana metoda HPLC ilościowego oznaczania cefuroksymu sodowego w 1 % i 5 % roztworach wodnych, w 1 % i 5 % kroplach recepturowych oraz kroplach „przemysłowych” charakteryzowała się : specyficznością, dokładnością, precyzją oraz liniowością w wymaganym zakresie stężeń. Opracowana metoda nadaje się do seryjnych oznaczeń cefuroksymu sodowego w kroplach świeżo sporządzonych oraz w czasie ich przechowywania.

11. 1 % i 5 % „przemysłowe” krople do oczu z cefuroksymem sodowym, których technologia oparta jest na zastosowaniu odpowiednio skonstruowanych rozpuszczalników oraz na opakowaniu dwukomorowym, oddzielającym suchą (liofilizowaną) postać antybiotyku od rozpuszczalnika, może stanowić propozycję handlowej okulistycznej postaci leku. Tworzenie kropli gotowych do użycia, polegające na łączeniu obu składników jest nieskomplikowane, w odróżnieniu od recepturowych kropli i mało czasochłonne.

VII. Streszczenie

Cel pracy stanowiły badania nad technologią sporządzania i oceną fizykochemiczną: 1 % i 5 % (w/w) kropli do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych, rozpuszczalników do wersji „przemysłowych" kropli oraz 1 % i 5 % (w/w) kropli do oczu z antybiotykiem w wersjach „przemysłowych".

W oparciu o wcześniejsze badania prowadzone w Katedrze Technologii Postaci Leku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, opracowano cztery wersje recepturowe 5 % kropli z cefuroksymem , w których zmodyfikowano skład buforów cytrynianowych oraz dokonano testu zgodności farmaceutycznej z substancjami pomocniczymi, które w założeniu pracy miały być włączone do składu kropli.

Do oznaczania zmian zawartości cefuroksymu sodowego w badanych kroplach i roztworach wykorzystano wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC). Opracowaną metodę zwalidowano pod kątem: specyficzności, dokładności, precyzji i liniowości oraz wyznaczono granicę wykrywalności i oznaczalności cefuroksymu sodowego. Ponadto dokonano oceny wpływu niewielkich zaplanowanych zmian na parametry analizy chromatograficznej – robustness.

W następnym etapie badań, wykonano po cztery wersje recepturowe 1 % kropli i 5 % z cefuroksymem sodowym, które przechowywano w temperaturze 4 °C i 20 °C. Ponadto jako próby odniesienia w prowadzonych analizach, zostały wykonane roztwory wodne antybiotyku o takim samym stężeniu. Krople i roztwory wodne w trakcie 30 dni przechowywania, zostały poddane ocenie fizykochemicznej, która obejmowała badania: pH, ciśnienia osmotycznego, lepkości w przypadku wersji z dodatkiem alkoholu poliwinylowego oraz analizę zmiany zawartości cefuroksymu sodowego, za pomocą metody HPLC.

Wyniki badań wskazywały, że wszystkie wersje kropli recepturowych pod względem właściwości fizycznych były zgodne z wymogami farmakopealnymi oraz spełniały założenia celu pracy. Trwałość określona czasem, w którym zawartość cefuroksymu w kroplach przechowywanych w temperaturze 4 °C i chronionych przed światłem utrzymywała się na poziomie nie niższym jak 90 % początkowego stężenia wynosiła od 15 do 30 dni, w zależności od wersji recepturowej. Stwierdzono, że decydujący wpływ

na trwałość cefuroksymu sodowego w 1 % i 5 % (w/w) kroplach do oczu miała temperatura przechowywania, natomiast nie miało wpływu stężenie antybiotyku.

W oparciu o uzyskane wyniki badań fizykochemicznych 1 % i 5 % (w/w) kropli recepturowych, opracowano skład i sposób sporządzania rozpuszczalników do „przemysłowych" kropli z cefuroksymem sodowym. Zgodnie z wytycznymi ICH Q1A(R2), dokonano oceny jakościowej rozpuszczalników świeżo sporządzonych oraz w trakcie przechowywania w komorach klimatycznych, przez okres 6 miesięcy w temperaturze 40 °C, przy wilgotności względnej 75 % RH ± 5% RH oraz przez okres 12 miesięcy w temperaturze 25 °C, przy wilgotności względnej 60 % RH ± 5% RH. Ponadto po przeprowadzonym teście długoterminowym, w przypadku wersji rozpuszczalników konserwowanych, dodatkowo wykonano badanie skuteczności przeciwdrobnoustrojowej wg FP VII. Wyniki otrzymanych badań wskazywały, że skład i sposób sporządzenia rozpuszczalników będzie gwarantował zgodność kropli przemysłowych z wymogami farmakopealnymi oraz założeniami przyjętymi w celu pracy.

Krople 1 % i 5 % (w/w) w wersjach „przemysłowych" wykonano poprzez bezpośrednie połączenie cefalosporyny z odpowiednią wersją rozpuszczalnika, co miało odwzorowywać połączenie zawartości dwukomorowego opakowania handlowego przez pacjenta, gdzie w jednej komorze znajdowała się sucha, liofilizowana postać antybiotyku, a w drugiej vehiculum. W odróżnieniu od metody recepturowej, taki sposób wykonania kropli okazał się prostszy i szybszy. W celu zbadania wpływu metodyki sporządzania kropli oraz warunków przechowywania rozpuszczalników na trwałość cefuroksymu, krople w wersjach „przemysłowych" wykonano na świeżych rozpuszczalnikach oraz na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej testowi przyśpieszonego starzenia w komorach klimatycznych, przez okres 6 miesięcy w temperaturze 40 °C, przy wilgotności 75 % RH ± 5% RH.

Zarówno świeżo sporządzone 1 % i 5 % (w/w) krople „przemysłowe", jak i przechowywane w temperaturze 4 °C w ciągu 30 dni poddano ocenie fizykochemicznej, zgodnie z kryteriami wcześniej przyjętymi dla wersji recepturowych kropli.

Trwałość 1 % i 5 % kropli „przemysłowych" sporządzonych na świeżo sporządzonych rozpuszczalnikach i przechowywanych w temperaturze 4 °C w zależności od ich składu wynosiła od 24 do 30 dni i była nieco wyższa niż kropli recepturowych. Trwałość

1% i 5 % kropli „przemysłowych” sporządzonych na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej procesowi przyspieszonego starzenia wynosiła od 18 do 24 dni, w zależności od wersji.

Z przeprowadzonych badań wynikało, że krótkotrwała ekspozycja rozpuszczalników na temperaturę wyższą niż deklarowana temperatura przechowywania, wynosząca 25 ºC ± 2 ºC, nie powinna negatywnie wpłynąć na właściwości fizyczne oraz trwałość cefuroksymu w kroplach, ponieważ ponad 90 % spadek zawartości antybiotyku uzyskano dopiero po kilkunastu dniach przechowywania kropli w temperaturze 4 °C, co umożliwia przeprowadzenie w tym czasie pełnej terapii przez pacjenta, przy użyciu jednego opakowania leku.

VII. Summary

Title of the doctoral dissertation: “Stability of cefuroxime in eye drops.”

The aim of the studies was the development of the preparation technology and the analysis of physical and chemical properties of 1% and 5% (w/w) eye drops containing sodium cefuroxime in pharmaceutical versions, solvents for “industrial” versions of drops, and 1% and 5% (w/w) eye drops containing the antibiotic in “industrial” versions.

Four pharmaceutical versions of 5% drops containing cefuroxime were prepared based on the results of previous studies carried out in the Department of Drug Form Technology of Poznan University of Medical Science. The composition of citrate buffers in the drops was modified and the test of pharmaceutical compatibility with the additives, which were to be included in the drops' composition, was performed.

High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the changes in the content of sodium cefuroxime in the analysed drops and solutions. The developed method was validated in terms of specificity, accuracy, precision and linearity, and the limits of detection and quantitation for sodium cefuroxime were also established. Besides, the influence of small predetermined changes on the chromatographic analysis parameters – robustness – was evaluated.

At the next stage of analysis, four pharmaceutical versions of 1% and 5% drops containing sodium cefuroxime were prepared, they were stored at the temperature of 4°C and 20°C. Apart from that, aqueous solutions of the antibiotic at the same concentration were made as reference tests in the conducted studies. During the storage of thirty days the drops and aqueous solutions underwent physical and chemical evaluation which consisted of pH and osmotic pressure studies, viscosity analysis of the version with added polyvinyl alcohol and the studies of the changes in the content of sodium cefuroxime using HPLC.

The results of the studies showed that in terms of physical properties all pharmaceutical versions of the drops met the pharmacopoeial requirements and the defined purpose of

the studies. The stability, defined by the time during which the content of cefuroxime in the drops stored at the temperature of 4°C and protected from light did not drop below the level of 90% of the initial concentration, equalled from 15 to 30 days depending on the pharmaceutical version. It was proved that the decisive factor having influence on the stability of sodium cefuroxime in 1% and 5% (w/w) eye drops was the storage temperature, whereas the concentration of the antibiotic did not have any impact on it.

The achieved results of physical and chemical studies of 1% and 5% (w/w) pharmaceutical drops enabled to develop the composition and the preparation method of solvents for "industrial" drops containing sodium cefuroxime. Following ICH Q1A(R2) requirements, the quality evaluation was performed right after the preparation of the solvents and during their storage in climatic chambers for 6 months at the temperature of 40°C at the relative humidity of 75% RH ± 5% RH, and for 12 months at the temperature of 25°C at the relative humidity of 60% RH ± 5% RH. Besides, after the long-term assay was conducted the preserved version of the solvents underwent additional antimicrobial efficiency assessment in accordance with PPh VII. The achieved results of the studies showed that the composition and the preparation method of solvents would guarantee the compatibility of "industrial" drops with the pharmacopoeial requirements and the defined purpose of the studies.

The "industrial" versions of 1% and 5% (w/w) drops were prepared by direct mixing of cephalosporin with an appropriate version of the solvent, which was to replicate the mixing of the contents of commercial two-compartment packaging by the patient, in which one part contains dry lyophilised form of the antibiotic and the other contains the vehiculum. In comparison with the pharmaceutical method this way of preparation turned out to be simpler and faster. In order to evaluate the influence of the preparation procedure and the storage conditions of solvents on the stability of cefuroxime the commercial versions of drops were made from fresh solvents, and from those which had gone through accelerated ageing in climatic chambers for 6 months at the temperature of 40°C at the humidity of 75% RH ± 5% RH.

Both versions of 1% and 5% (w/w) "commercial" drops, i.e. freshly made and those which were stored at the temperature of 4°C for 30 days, underwent physical and chemical assessment in accordance with the criteria previously accepted for the pharmaceutical versions of the drops.

The stability of 1% and 5% “industrial” drops made from fresh solvents and stored at the temperature of 4°C, depending on their composition, equalled from 24 to 30 days and was slightly higher than the stability of the pharmaceutical drops. The stability of 1% and 5% “commercial” drops made from the solvents which had undergone the process of accelerated ageing was from 18 to 24 days, depending on the version.

The results of the studies proved that the short exposure of solvents to higher temperature than the required temperature of storage of 25°C ± 2°C, should not have any negative influence on physical properties and the stability of cefuroxime in the drops because the decrease of the antibiotic content over 90% was achieved only after more than 10 days of storage of the drops at the temperature of 4°C, which shows that during that time it is possible to perform the complete therapy of a patient using one package of the medication.

VIII. PIŚMIENNICTWO

1. Lambert H.P., O'Grady F.: Antybiotyki i Chemioterapia. Wydawnictwo Medyczne, Warszawa, 1994
2. Hryniewicz W., Meszaros J.: Antybiotyki w profilaktyce i leczeniu zakażeń. PZWL, Warszawa, 2001
3. Marshall W.F., Blair J.E.: The Cephalosporins. Mayo Clin Proc, 1999, 74, 187 - 195
4. Zając M., Pawełczyk E., Jelińska A.: Chemia leków dla studentów farmacji i farmaceutów. Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań, 2001
5. Janiec W., Krupińska J.: Farmakodynamika. PZWL, Warszawa, 2005
6. Kostowski W., Herman Z. Farmakologia. PZWL, Warszawa, 2008
7. James C.W., Gurk - Turner C.: Cross – reactivity of beta – lactam antibiotics. Bayl Univ Med Cent, 2001, 14, 106 – 107
8. Pałczyński C., Jakubowski J.: Alergia na antybiotyki beta-laktamowe. Alerg Astma Imun, 1996, 1, 125 - 130
9. Herbert M.E., Brewster G.S., Lanctot – Herbert M.: Ten percent of patients who are allergic to penicillin will have serious reactions if exposed to cephalosphorins. West J Med, 2000, 172, 341
10. Pichichero M.E.: Use of selected cephalosporins in penicillin-allergic patients: a paradigim shift. Diagn Microbiol Infect Dis, 2007, 57, 13 – 18
11. Pichichero M.E.: Cephalosporins can be prescribed safely for penicillin – allergic patients. J Fam Pract, 2006, 55, 106 – 112
12. Pollack E.S., Pollack C.V.: Antibiotic use in the emergency department: I. The penicillins and cephalosporins. J Emerg Med, 1996, 14, 213 – 222
13. James P.A., Reeves D.S.: Bacterial resistance to cephalosporins as a function of outer membrane permeability and access to their target. J Chemother, 1996, 8, 37 – 47
14. Rayamajhi N., Kang S.G., Lee D.Y., Kang M.L., Lee S.I., Park K.Y., Lee H.S., Yoo H.S.: Characterization of TEM-, SHV- and AmpC – type β-lactamases from cephalosporins - resistant Enterobacteriaceae isolated from swine. Int J Food Microbiol, 2008, 124, 183 – 187

15. Bradford P.A.: Extended-spectrum β-lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microb Rev, 2001, 14, 933 - 951
16. Shah A.A., Hasan F., Ahmed S, Hameed A.: Extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) : characterization, epidemiology and detection. Crit Rev Microbiol, 2004, 30, 25 – 32
17. Livermore D.M., Yuan M.: Antibiotic resistance and production of extended – spectrum beta-lactamases amongst *Klebsiella spp*. from intensive care unit in Europe. J Antimicrob Chemother, 1996, 38, 409 - 424
18. Knothe H., Shah P., Krcmery V., Antal M., Mitsuhashi S.: Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection, 1983, 11, 315 – 317
19. Labia R.: Plasticity of class A β-lactamases, an illustration with TEM and SHV enzymes. Curr Med Chem – Anti-Infective Agents, 2004, 3, 251 - 266
20. Vahaboglu H., Öztürk R., Aygün G., Coşkunkan F., Yaman A., Kaygusuz A., Leblebicioglu H., Balik I., Aydin K., Otkun M.: Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum β-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41, 2265 – 2269
21. Girlich D., Poirel L., Leelaporn A., Karim A., Tribuddharat C., Fennewald M., Nordmann P.: Molecular epidemiology of the integron – located VEB-1 extended-spectrum β-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. J Clin Microbiol, 2001, 39, 175 – 182
22. Osano E., Arakawa Y., Wacharotayankun R., Ohta M., Horii T., Ito H., Yoshimura F., Kato N.: Molecular characterization of an enterobacterial metallo β-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. Antimicrob Agents Chemother, 1994, 38, 71 – 78
23. Watanabe M., Iyobe S., Inoue M., Mitsuashi S.: Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 1991, 35, 147 – 151
24. Fenollar – Ferrer C., Frau J., Donoso J., Mũnoz F.: Evolution of class C β-lactamases: factor influencing their hydrolysis and recognition mechanism. Theor Chem Account, 2008, 121, 209 – 218

25. Bou G., Martinez – Beltrán J.: Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an Amp C β-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44, 428 – 432
26. Jacoby G.A.: AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev, 2009, 22, 161 - 182
27. Naas T., Nordmann P.: OXA – type β-lactamases. Curr Pharm Des, 1999, 5, 865 – 879
28. Sumita Y., Fukasawa M.: Potent activity of meropenem against *Escherichia coli* arising from its simultaneous binding to penicillin-binding proteins 2 and 3. J Antimicrob Chemother, 1995, 36, 53 – 64
29. Clark R.B.: Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii* : association with reduced expression of a 33 – 36 kDa outer membrane protein. J Antimicrob Chemother, 1996, 38, 245 - 251
30. Farra A., Islam S., Strålfors A., Sörberg M., Wretlind B.: Role of outer membrane protein OprD and penicillin binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. Int J Antimicrob Agents, 2008, 31, 427 - 433
31. Zhang D., Jiang B., Xiang Z., Wang S.: Functional characterisation of altered outer membrane proteins for tetracycline resistance in *Escherichia coli.* Int J Antimicrob Agents, 2008, 32, 315 - 319
32. Brzozowski T., Kasprowicz A., Jachowicz R. (red.), Filipek B., Czech A.: Leki stosowane w terapii okulistycznej. Ośrodek informacji naukowej „POLFA", Warszawa, 2001
33. Janicki S., Fiebig A., Sznitowska M. (red.): Farmacja Stosowana. Podręcznik dla studentów farmacji. PZWL, Warszawa, 2003
34. Chedru – Legros V.: High concentration antibiotic eye drops. EJHP Practice, 2008, 14, 51 – 52
35. Zimmerman T.J., Kooner K.S., Sharir M., Fechtner R.D.: Textbook of ocular pharmacology. Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia, 1997
36. Kański J.J.: Okulistyka kliniczna. Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2007
37. Niżankowska M.H.: Okulistyka. Podstawy kliniczne. PZWL, Warszawa, 2007
38. Onofrey B.E., Skorin L. Jr., Holdeman N.R.: Ocular therapeutics handbook. A clinical manual. Lippincott – Raven Publishers, New York, 1998
39. Kański J.J., Pavésio C.E., Tuft S.J.: Choroby zapalne oczu. Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2006

40. Zagórski Z., Nauman G., Watson P.: Choroby twardówki, rogówki i powierzchni oka. Czelej, Lublin, 2008
41. Farmakopea Polska VIII. Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, Warszawa, 2008
42. The European Pharmacopoeia 6.0. Council of Europe, Strasbourg, 2007
43. USP 32 – NF 27. The United States Pharmacopeial Convention, Twinbrook Parkway, Rockville, 2009
44. Sultana N., Arayne M.S.: In vitro activity of cefazoline and cefuroxime in presence of essential and trace elements. Pak J Pharm Sci, 2002, 2, 41 – 50
45. AHFS Drug Information Essentials 2004 – 05. American Society of Health – System Pharmacists, Bethesda, 2004
46. Dzierżanowska D**.:** Kompendium antybiotyków. Alfa Medica Press, Bielsko-Biała, 2002
47. You-Wai-Man P., Morgan S.J., Hildreth A.J., Steel D.H., Allen D.: Efficacy of intracameral and subconjunctival cefuroxime in preventing endophthalmitis after cataract surgery. J Cataract Refract Surg, 2008, 34, 447 – 451
48. Montan P.G., Wejde G., Koranyi G., Rylander M.: Prophylactic intracameral cefuroxime. Efficacy in preventing endophthalmitis after cataract surgery. J Cataract Refract Surg, 2002, 28, 977 – 981
49. Gupta M.S., McKee H.D.R., Saldaña M., Stewart O.G.: Macular thickness after cataract surgery with intracameral cefuroxime. J Cataract Refract Surg, 2005, 31, 1163 – 1166
50. Özkan B., Karabaş V.L., Gündeş S., Altintaş Ö., Etiler N., Cağlar Y.: Effect of vancomycin, teicoplanin, and cefuroxime on *Staphylococcus epidermidis* adherence to intraocular lenses. J Cataract Refract Surg, 2005, 31, 1814 – 1820
51. Gore D.M., Angunawela R.I., Little B.C.: United Kingdom survey of antibiotic prophylaxis practice after publication of the ESCRS Endophthalmitis Study. J Cataract Refract Surg, 2009, 35, 770 – 773
52. Gower P.E., Dash C.H.: The pharmacokinetics of cefuroxime after intravenous injection. Eur J Clin Pharmacol, 1977, 12, 221 – 227

53. Bundtzen R.W., Toothaker R.D., Nielson O.S., Madsen P.O., Welling P.G. Craig W.A.: Pharmacokinetics of cefuroxime in normal and impaired renal function: comparison of high-pressure liquid chromatography and microbiological assays. Antimicrob Agents Chemother, 1981, 19, 443 – 449
54. Podlewski J., Chwalibogowska - Podlewska A.: Leki współczesnej terapii. Medical Tribune, Warszawa, 2009
55. Trissel L.A.: Handbook on injectable drugs 13th Ed. American Society of Health – System Pharmacist, Maryland, 2005
56. Wang D., Notari R.E.: Cefuroxime hydrolysis kinetics and stability predictions in aqueous solution. J Pharm Sci, 2006, 83, 577 - 581
57. Das Gupta V., Stewart K.R.: Stability of cefuroxime sodium in some aqueous buffered solutions and intravenous admixtures. J Clin Hosp Pharm, 1986, 11, 47-54
58. Connors K.A., Amidon G.L., Kennon L.: Chemical stability of pharmaceuticals. John Wiley & Sons, New York, 1979
59. Rose U.: In Situ Degradation: a New concept for system suitability test in monographs of the European Pharmacopoeia. J Pharm Biomed Anal, 1998, 18, 1-14
60. Müller H.J., Howe K., Frank C., Haker I.: Stability of cefazolin, cefotiam, cefuroxime, cefotaxime, ceftriaxone and ceftazidime in normal saline solutions, stored in a new i.v. container made of Biofine. Eur Hosp Pharm, 2000, 6, 17 - 23
61. Galanti L.M., Hecq J.D., Vanbeckbergen D., Jamart J.: Long-term stability of cefuroxime sodium and cefazolin sodium in intravenous infusions. J Clin Pharm Ther, 1996, 21, 185-189
62. Rodenbach M.P., Hecq J.D., Vanbeckbergen D, Jamart J., Galanti L.: Stability of Cefuroxime infusion: the brand-name drug versus a generic product. EJHP Science, 2006 ,12, 32 – 34
63. Faouzi M.A., Dine T., Luyckx M., Gressier B., Brunet C., Goudaliez F., Mallevais M.L., Cazin M., Cazin J.C.: Stability and compatibility of cefaloridine, cefuroxime, and ceftazidime with PVC infusion bags. Pharmazie, 1994, 49, 425 - 427
64. Hecq J.D., Schlesser V., Vanbeckbergen D., Jamart J., Galanti L.: Effect of freezing, long-term storage and microwave thawing on the stability of cefuroxime sodium in 5% dextrose infusion polyvinyl chloride bags. EJHP Science, 2005, 11, 23 - 25

65. Hecq J.D, Boitquin L.P., Vanbeckbergen D.F., Jamart J., Galanti L.M.: Effect of the freezing conditions and microwave thawing power on the stability of cefuroxime in dextrose 5% infusion polyolefin bags at 4 °C. Ann Pharmacother, 2005, 39, 1244-1248
66. Oldham G.B.: Formulation and stability of cefuroxime eye drops. Int J Pharm Pract, 1992, 1, 19 – 22
67. Hebron B., Scott H.: Shelf life of cefuroxime eye-drops when dispensed in artificial tear preparations. Int J Pharm Pract, 1993, 2, 163 – 167
68. Kodym A., Zawisza T., Taberska J., Kukuła H.: Physicochemical and microbiological properties of eye drops containing cefuroxime**.** Acta Pol Pharm, 2006, 63, 293-299.
69. Uhart M., Pirot F., Boillon A., Senaux E., Tall L., Diouf E., Burillon C., Padois K., Falson F., Leboucher G., Pivot C.: Assessment of sodium hyaluronate gel as vehicle for intracameral delivery of cefuroxime in endophthalmitis prophylaxis. Int J Pharm, 2010, 398, 14 - 20
70. Hill D.G., Barnes A.R.: Compatibility of Phenylmercuric Acetate with Cefuroxime and Ceftazidime Eye Drops. Int J Pharm, 1997, 147, 127-129.
71. Barnes A.R., Nash S. Preservative efficacy in cefuroxime and ceftazidime eye drops formulations. J Clin Pharm Ther, 1994, 19, 327 – 332.
72. Zawisza T.: Technologia kropli do oczu z cefazoliną, cefuroksymem i z ceftazydymem. Praca doktorska wykonana w Katedrze Technologii Postaci Leku Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2004
73. Farmakopea Polska VI. Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, Warszawa, 2002
74. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2). ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2003
75. Farmakopea Polska VII, Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, Warszawa, 2006
76. Pawlaczyk J., Zając M.: Walidacja metod analizy chemicznej. Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań, 2005

77. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005
78. Witkiewicz Z.: Podstawy chromatografii. Wydawnictwo Naukowo Techniczne, Warszawa, 2005
79. Danysz A.: Antibiotic therapy in ophthalmology. Okulistyka, 2000, 3, 3-13
80. Thomas T., Galiani D., Brod R.D.: Gentamicin and other antibiotic toxicity. Ophthalmol Clin North Am, 2001, 14, 611- 624
81. Farmakopea Polska V, tom I. PZWL, Warszawa, 1990
82. Kodym A. Patent Nr 198337 zgłoszony 11.04.2001 udzielony przez Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej w dniu 30.06.2008 na wynalazek pt. „Sposób wytwarzania kropli do oczu zawierających cefuroksym."

IX. Spis tabel

Numer strony

Tabela 1. Skład buforów cytrynianowych……. 48

Tabela 2. Ocena fizyczna sporządzonych buforów cytrynianowych……. 49

Tabela 3. Skład roztworu alkoholu poliwinylowego (PVA)……. 49

Tabela 4. Ocena fizyczna roztworu alkoholu poliwinylowego (PVA) przeznaczonego do wykonania kropli recepturowych……. 50

Tabela 5. Skład 0,04 % (w/w) roztworu boranu fenylortęciowego……... 50

Tabela 6. Badanie zgodności farmaceutycznej cefuroksymu sodowego w 5 % roztworach wodnych z substancjami pomocniczymi włączonymi do składu kropli……... 52

Tabela 7. Skład rozpuszczalników przeznaczonych do wersji „przemysłowych" 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym…….. 54

Tabela 8. Ocena fizyczna rozpuszczalników przeznaczonych do 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych" po 3 i 6 miesiącach przechowywania w temperaturze 25 ^{0}C ± 2ºC, przy wilgotności 60 % RH ± 5% RH…… 57

Tabela 9. Ocena fizyczna rozpuszczalników przeznaczonych do 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych" po 9 i 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 25 ^{0}C ± 2ºC, przy wilgotności 60 % RH ± 5% RH…… 58

Tabela 10. Ocena fizyczna rozpuszczalników przeznaczonych do 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych" po 3 i 6 miesiącach przechowywania w temperaturze 40 ^{0}C ± 2ºC, przy wilgotności 75 % RH ± 5% RH…… 59

Tabela 11. Wymogi testu konserwacji wg FP VII dla preparatów do oczu – kryterium A……... 65

Tabela 12. Wyniki testu konserwacji dla rozpuszczalników nr 2 i nr 4, przeznaczonych do sporządzania 1 % kropli w wersjach „przemysłowych", po 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 25 °C ± 2 ºC/60 % RH ± 5% RH……. 66

Tabela 13. Wyniki testu konserwacji dla rozpuszczalników nr II i nr IV, przeznaczonych do sporządzania 5 % kropli w wersjach „przemysłowych”, po 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 25 °C ± 2 ºC/60 % RH ± 5% RH……. 66

Tabela 14. Procedury wyjaławiania sprzętu wykorzystanego do pracy w warunkach aseptycznych……... 68

Tabela 15. Skład 1 % i 5 % (w/w) kropli recepturowych z cefuroksymem sodowym oraz roztworów wodnych antybiotyku…….. 70

Tabela 16. Uzasadnienie zaprogramowanego składu recepturowych kropli…….... 71

Tabela 17. Skład 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych”, sporządzonych na świeżo wykonanych rozpuszczalnikach oraz na rozpuszczalnikach przechowywanych przez 6 miesięcy w warunkach przyspieszonego starzenia w temperaturze 40 ^{0}C ± 2ºC / 75 % RH ± 5% RH…… 75

Tabela 18. Zmiana wartości pH w 1 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych i w wodnych roztworach antybiotyku, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C…….. 80

Tabela 19. Zmiana wartości pH w 5 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych i w wodnych roztworach antybiotyku, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C…….. 81

Tabela 20. Zmiana wartości pH w 1 % i 5 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych”, sporządzonych na świeżo wykonanych rozpuszczalnikach, przechowywanych w temperaturze 4 °C……... 84

Tabela 21. Zmiana wartości pH w 1 % i 5% (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych”, sporządzonych na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej testowi przyspieszonego starzenia (6 miesięcy, 40 ^{0}C ± 2 ^{0}C/75 RH ±5 RH), przechowywanych w temperaturze 4 °C…… 86

Tabela 22. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 1 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych i w wodnych roztworach antybiotyku, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C……... 88

Tabela 23. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 5 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodu w wersjach recepturowych i w wodnych roztworach antybiotyku, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C. …….. 89

Tabela 24. Zmiana wartości ciśnienienia osmotycznego w 1 % i 5 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych”, sporządzonych na świeżo wykonanych rozpuszczalnikach, przechowywanych w temperaturze 4 °C…… 92

Tabela 25. Zmiana wartości ciśnienienia osmotycznego w 1 % i 5 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych”, sporządzonych na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej testowi przyspieszonego starzenia (6 miesięcy, 40 ^{0}C ± 2 ^{0}C/75 RH ±5 RH), przechowywanych w temperaturze 4 °C……. 94

Tabela 26. Zmiana lepkości w 1 % i 5 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C……... 96

Tabela 27. Zmiana lepkości w 1 % i 5 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych”, wykonanych na świeżo sporządzonych rozpuszczalnikach, przechowywanych w temperaturze 4 °C……... 97

Tabela 28. Zmiana lepkości w 1 % i 5 % (w/w) kroplach do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych”, wykonanych na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej testowi przyśpieszonego starzenia (6 miesięcy, 40 ^{0}C ± 2 ^{0}C/75 RH ± 5 RH), przechowywanych w temperaturze 4 °C…….. 97

Tabela 29. Ocena organoleptyczna 1 % i 5 % (w/w) kropli do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach recepturowych, w dniu sporządzenia i po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20^{0}C……. 98

Tabela 30. Ocena organoleptyczna 1 % i 5 % (w/w) kropli do oczu z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych”, w dniu sporządzenia i po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C… 99

Tabela 31. Warunki rozdziału chromatograficznego……... 100

Tabela 32. Skład buforu octanowego pH 3,4……... 101

Tabela 33. Zależność pola powierzchni od stężenia cefuroksymu sodowego dla krzywej kalibracyjnej A……. 102

Tabela 34. Zależność pola powierzchni od stężenia cefuroksymu sodowego dla krzywej kalibracyjnej B……. 103

Tabela 35. Zależność pola powierzchni od stężenia cefuroksymu sodowego dla krzywej kalibracyjnej C……. 103

Tabela 36. Zależność pola powierzchni od stężenia cefuroksymu sodowego dla krzywej kalibracyjnej D…… 104

Tabela 37. Analiza regresji krzywych wzorcowych A i B…….. 106

Tabela 38. Analiza regresji krzywych wzorcowych C i D…….. 107

Tabela 39. Wyniki oznaczeń cefuroksymu sodowego w mieszaninach modelowych a i b……... 113

Tabela 40. Wyniki oznaczeń cefuroksymu sodowego w mieszaninach modelowych c i d……... 114

Tabela 41. Wyniki oznaczeń cefuroksymu sodowego w mieszaninach modelowych e i f……... 115

Tabela 42. Wyniki oznaczeń cefuroksymu sodowego w mieszaninach modelowych g i h…….. 116

Tabela 43. Granica wykrywalności cefuroksymu sodowego…….. 117

Tabela 44. Granica oznaczalności cefuroksymu sodowego…… 118

Tabela 45. Wpływ zamiany temperatury kolumny chromatograficznej na pole powierzchni i czas retencji analitu na przykładzie analizy roztworu wodnego cefuroksymu sodowego – w1……. 120

Tabela 46. Wpływ zamiany zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej na pole powierzchni i czas retencji analitu, na przykładzie analizy roztworu wodnego cefuroksymu sodowego – w2…… 120

Tabela 47. Wpływ zamiany pH fazy ruchomej na pole powierzchni i czas retencji analitu, na przykładzie analizy roztworu wodnego cefuroksymu sodowego – w3……. 121

Tabela 48. Przykładowe parametry rozdziału chromatograficznego wyznaczone dla cefuroksymu sodowego w 1 % i 5 % (w/w) kroplach świeżo sporządzonych, jak i w 30 dniu przechowywania dla wersji nr 4 i IV……. 131

Tabela 49. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % roztworach wodnych, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C przez 30 dni..... 134

Tabela 50. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach recepturowych w wersji 1R, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C przez 30 dni…….. 135

Tabela 51. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach recepturowych w wersji 2R przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C przez 30 dni…….. 136

Tabela 52. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach recepturowych w wersji 3R, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C przez 30 dni……... 137

Tabela 53. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach recepturowych w wersji 4R, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20°C przez 30 dni…… 138

Tabela 54. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % roztworach wodnych, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C przez 30 dni…….. 139

Tabela 55. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach recepturowych w wersji IR, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C przez 30 dni…… 140

Tabela 56. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach recepturowych w wersji IIR, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C przez 30 dni……..... 141

Tabela 57. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach recepturowych w wersji IIIR, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C przez 30 dni…….. 142

Tabela 58. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach recepturowych w wersji IVR, przechowywanych w temperaturze 4 °C i 20 °C przez 30 dni……. 143

Tabela 59. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach „przemysłowych” w wersji 1P0 i 2P0, przechowywanych w temperaturze 4°C przez 30 dni…….. 146

Tabela 60. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach „przemysłowych” w wersji 3P0 i 4P0, przechowywanych w temperaturze 4 °C przez 30 dni……. 147

Tabela 61. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach „przemysłowych” w wersji IP0 i IIP0, przechowywanych w temperaturze 4 °C przez 30 dni……. 148

Tabela 62 Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach „przemysłowych” w wersji IIIP0 i IVP0, przechowywanych w temperaturze 4 °C przez 30 dni……. 149

Tabela 63. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach „przemysłowych” w wersji 1P6 i 2P6, przechowywanych w temperaturze 4 °C przez 30 dni……. 151

Tabela 64. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach „przemysłowych” w wersji 3P6 i 4P6 przechowywanych w temperaturze 4 °C przez 30 dni……. 152

Tabela 65. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach „przemysłowych” w wersji IP6 i IIP6, przechowywanych w temperaturze 4 °C przez 30 dni……. 153

Tabela 66. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach „przemysłowych” w wersji IIIP6 i IVP6, przechowywanych w temperaturze 4 °C przez 30 dni……. 154

Tabela 67. Spadek stężenia cefuroksymu w świeżo sporządzonych 1 % i 5 % (w/w) roztworach antybiotyku w 1% roztworze trietyloaminy i 0,1 mol/L roztworze NaOH……. 162

Tabela 68. Trwałość kropli wyrażona w dniach, w których utrzymywała się jeszcze 90 % zawartość cefuroksymu sodowego, w odniesieniu do dnia ich wykonania…… 173

X. Spis rycin

Numer strony

Rycina 1. Kwas 7 – aminocefalosporynowy (R_1, R_2, R_3 = H)……. 9

Rycina 2. Wzór strukturalny cefuroksymu sodowego……. 30

Rycina 3. Zmiany pH w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 1 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 12-stu miesięcy w temperaturze 25 ºC ± 2 ºC/60 RH ± 5 RH…….. 60

Rycina 4. Zmiany pH w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 12-stu miesięcy w temperaturze 25 ºC ± 2 ºC/60 RH ± 5 RH……... 60

Rycina 5. Zmiany pH w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 1 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 ºC ± 2ºC/75 RH ± 5RH……. 61

Rycina 6. Zmiany pH w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 ºC ± 2ºC/75 RH ± 5RH……. 61

Rycina 7. Zmiany ciśnienia osmotycznego w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 1 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 12-stu miesięcy w temperaturze 25 ºC ± 2 ºC/60 RH ± 5 RH…… 62

Rycina 8. Zmiany ciśnienia osmotycznego w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 12-stu miesięcy w temperaturze 25 ºC ± 2 ºC/60 RH ± 5 RH…… 62

Rycina 9. Zmiany ciśnienia osmotycznego w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 1 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 ºC ± 2ºC/75 RH ± 5RH……. 63

Rycina 10. Zmiany ciśnienia osmotycznego w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 °C ± 2 °C/75 RH ± 5RH……. 63

Rycina 11. Zmiany lepkości w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych", podczas przechowywania w okresie 12-stu miesięcy w temperaturze 25 °C ± 2 °C/60 RH ± 5 RH……... 64

Rycina 12. Zmiany lepkości w rozpuszczalnikach przeznaczonych do sporządzania 1 % i 5 % (w/w) kropli z cefuroksymem sodowym w wersjach „przemysłowych" podczas, przechowywania w okresie 6-ciu miesięcy w temperaturze 40 °C ± 2 °C/75 RH ± 5 RH…….. 64

Rycina 13. Zmiana wartości pH w 1 % roztworach wodnych cefuroksymu sodowego, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni……. 82

Rycina 14. Zmiana wartości pH w 1 % kroplach recepturowych z cefuroksymem sodowym w wersjach 1R i 2R, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni…….. 82

Rycina 15. Zmiana wartości pH w 1 % kroplach recepturowych z cefuroksymem sodowy w wersjach 3R i 4R, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni…….. 82

Rycina 16. Zmiana wartości pH w 5 % roztworach wodnych cefuroksymu sodowego, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni…….. 83

Rycina 17. Zmiana wartości pH w 5 % kroplach recepturowych z cefuroksymem sodowym w wersjach IR i IIR, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni……. 83

Rycina 18. Zmiana wartości pH w 5 % kroplach recepturowych z cefuroksymem sodowym w wersjach IIIR i IVR, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni…….. 83

Rycina 19. Zmiana wartości pH w 1 % kroplach „przemysłowych" z cefuroksymem sodowym w wersjach P0, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni…… 85

Rycina 20. Zmiana wartości pH w 5 % kroplach „przemysłowych" z cefuroksymem sodowym w wersjach P0, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni…… 85

Rycina 21. Zmiana wartości pH w 1 % kroplach „przemysłowych" z cefuroksymem sodowym w wersjach P6, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni……... 87

Rycina 22. Zmiana wartości pH w 5 % kroplach „przemysłowych" z cefuroksymem sodowym w wersjach P6, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni……... 87

Rycina 23. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 1 % roztworach wodnych cefuroksymu sodowego, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni…….. 90

Rycina 24. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 1 % kroplach recepturowych z cefuroksymem sodowym w wersjach 1R i 2R, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni. 90

Rycina 25. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 1 % kroplach recepturowych z cefuroksymem sodowym w wersjach 3R i 4R, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni 90

Rycina 26. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 5 % roztworach wodnych cefuroksymu sodowego, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni…….. 91

Rycina 27. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 5 % kroplach recepturowych z cefuroksymem sodowym w wersjach IR i IIR, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni. 91

Rycina 28. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 5 % kroplach recepturowych z cefuroksymem sodowym w wersjach IIIR i IVR, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C i 20 ^{0}C przez 30 dni 91

Rycina 29. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 1 % kroplach „przemysłowych" z cefuroksymem sodowym w wersjach P0, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni……. 93

Rycina 30. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 5 % kroplach przemysłowych z cefuroksymem sodowym w wersjach P0, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni…….. 93

Rycina 31. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 1 % kroplach przemysłowych z cefuroksymem sodowym w wersjach P6, podczas „przechowywania" w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni……... 95

Rycina 32. Zmiana wartości ciśnienia osmotycznego w 5 % kroplach „przemysłowych" z cefuroksymem sodowym w wersjach P6, podczas przechowywania w temperaturze 4 ^{0}C przez 30 dni……. 95

Rycina 33. Krzywa kalibracyjna A…… 102

Rycina 34. Krzywa kalibracyjna B…… 103

Rycina 35. Krzywa kalibracyjna C…… 104

Rycina 36. Krzywa kalibracyjna D…… 104

Rycina 37. Chromatogram roztworu wodnego preparatu Biofuroksym (cefuroksym sodowy)…….. 109

Rycina 38. Chromatogram roztworu wodnego wzorca cefuroksymu sodowego (CRS)……... 109

Rycina 39. Chromatogram roztworu wszystkich substancji pomocniczych włączonych do składu kropli, o składzie jakościowym i ilościowym odpowiadającym wersji nr 4 1 % kropli…….. 110

Rycina 40. Widmo UV cefuroksymu sodowego w zakresie długości fali 200 nm – 400 nm…… 110

Rycina 41. Widmo UV roztworu wszystkich substancji pomocniczych włączonych do składu kropli, o składzie jakościowym i ilościowym odpowiadającym wersji nr 4 kropli 1%..... 111

Rycina 42. Chromatogram świeżo sporządzonych 1 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji recepturowej 4R …….. 123

Rycina 43. Chromatogram 1 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji recepturowej 4R, przechowywanych w temperaturze 4 °C, dzień 30…..... 124

Rycina 44. Chromatogram 1 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji recepturowej 4R, przechowywanych w temperaturze 20 ^{0}C, dzień 30…… 124

Rycina 45. Chromatogram świeżo sporządzonych 5 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji recepturowej IVR …… 125

Rycina 46. Chromatogram 5 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji recepturowej IVR, przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C, dzień 30…… 125

Rycina 47. Chromatogram 5 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji recepturowej IVR, przechowywanych w temperaturze 20 ^{0}C, dzień 30……. 126

Rycina 48. Chromatogram świeżo sporządzonych 1 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji „przemysłowej" 4P0…… 126

Rycina 49. Chromatogram 1 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji „przemysłowej" 4P0, przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C, dzień 30……... 127

Rycina 50. Chromatogram świeżo sporządzonych 5 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji „przemysłowej" IVP0…….. 127

Rycina 51. Chromatogram 5 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji „przemysłowej" IVP0, przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C, dzień 30……... 128

Rycina 52. Chromatogram świeżo sporządzonych 1 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji „przemysłowej" 4P6……. 128

Rycina 53. Chromatogram 1 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji „przemysłowej" 4P6, przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C, dzień 30…… 129

Rycina 54. Chromatogram świeżo sporządzonych 5 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji „przemysłowej" IVP6…….. 129

Rycina 55. Chromatogram 5 % kropli z cefuroksymem sodowym w wersji „przemysłowej" IVP6, przechowywanych w temperaturze 4 ^{0}C, dzień 30..... . 130

Rycina 56. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % roztworach wodnych i kroplach recepturowych, przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C ……... 144

Rycina 57. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % roztworach wodnych i kroplach recepturowych, przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 20 °C…….. 144

Rycina 58. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % roztworach wodnych i kroplach recepturowych, przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C ……. 145

Rycina 59. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % roztworach wodnych i kroplach recepturowych, przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 20 °C …….. 145

Rycina 60. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach „przemysłowych" w wersjach P0, przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4 °C ……... 150

Rycina 61. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach „przemysłowych" w wersjach P0, przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4 °C…… 150

Rycina 62. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 1 % kroplach „przemysłowych" w wersjach P6, przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C …… 155

Rycina 63. Zmiana zawartości cefuroksymu sodowego w 5 % kroplach „przemysłowych" w wersjach P6, przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C …… 155

Rycina 64. Chromatogram świeżo sporządzonego 1 % roztworu wodnego cefuroksymu sodowego ……. 156

Rycina 65. Chromatogram 1% roztworu wodnego cefuroksymu sodowego, ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 10 minut ……. 157

Rycina 66. Chromatogram świeżo sporządzonego 1 % roztworu cefuroksymu sodowego w buforze cytrynianowym o pH 3,8 ……. 157

Rycina 67. Chromatogram 1% roztworu cefuroksymu sodowego w buforze cytrynianowym o pH 3,8,ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 10 minut ……. 158

Rycina 68. Chromatogram świeżo sporządzonego 1 % roztworu cefuroksymu sodowego w buforze cytrynianowym o pH 6,5…….. 158

Rycina 69. Chromatogram 1% roztworu cefuroksymu sodowego w buforze cytrynianowym o pH 6,5, ogrzewanego w temperaturze 60 °C przez 10 minut ……. 159

Rycina 70. Widmo UV w zakresie długości fali 200 – 400 nm. I – widmo UV głównego produktu rozkładu pojawiającego się na chromatogramach przy czasie retencji t_R = 6,8, II - widmo UV cefuroksymu sodowego 159

Rycina 71. Chromatogram świeżo sporządzonego 1 % roztworu cefuroksymu sodowego w 1 % roztworze trietyloaminy…….. 160

Rycina 72. Chromatogram świeżo sporządzonego 1 % roztworu cefuroksymu sodowego w 0,1 mol/L roztworze NaOH……... 160

Rycina 73. Chromatogram świeżo sporządzonego 5 % roztworu cefuroksymu sodowego w 1 % roztworze trietyloaminy ……. 161

Rycina 74. Chromatogram świeżo sporządzonego 5 % roztworu cefuroksymu sodowego w 0,1 mol/L roztworze NaOH …… 161