

Dominika Hapka-Żmich

TRWAŁOŚĆ CEFTAZYDYMU W KROPLACH DO OCZU

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. n. farm. Anna Kodym

Poznań 2012

Serdecznie dziękuję

Promotorowi niniejszej rozprawy doktorskiej,

Pani dr hab. n. farm. Annie Kodym

za podanie tematu i umożliwienie wykonania niniejszej pracy w nowo powstałej Katedrze Technologii Postaci Leku Collegium Medicum w Bydgoszczy, którą Pani Profesor kierowała przez pierwsze, najtrudniejsze dla Katedry lata i stworzyła w tym czasie doskonale warunki do pracy naukowej i dydaktycznej.

Ponadto dziękuję Pani Profesor za wspaniałą szkołę naukową, opiekę promotorską, pomoc, ciągłą motywację i cenne uwagi na każdym etapie pracy, a także za niezwykłą życzliwość i zrozumienie.

Serdecznie dziękuję

Pani dr n. farm. Helenie Kukule

z Katedry i Zakładu Bakteriologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu za przeprowadzenie oceny mikrobiologicznej rozpuszczalników do kropli.

Serdecznie dziękuję

Zarządowi Farmaceutycznej Spółdzielni Pracy „Filofarm” w Bydgoszczy
za udostępnienie komór klimatycznych do przeprowadzenia badań stabilności rozpuszczalników do kropli.

Serdecznie dziękuję

Pani dr n. farm. Genowefie Pajchel,

Kierownikowi Pracowni Fizykochemicznych Właściwości Antybiotyków Narodowego Instytutu Leków, za cenne uwagi dotyczące interpretacji wyników trwałości preparatów z antybiotykami.

Pragnę serdecznie podziękować

zespołowi naukowemu Pani dr hab. n. farm. Anny Kodym, zajmującemu się technologią kropli do oczu z cefalosporynami, czyli moim Współpracownikiem. Dziękuję dr Andrzejowi Wiśniewskiemu, mgr Monice Pawłowskiej, mgr Piotrowi Bilskiemu za 8 lat wspierającej, twórczej i pełnej życzliwości współpracy.

Szczególnie gorąco dziękuję mojemu mężowi Michałowi za wsparcie i motywację do pracy oraz mojej córce Marysi za cierpliwość.

Spis treści

I WSTĘP	8
II CZĘŚĆ TEORETYCZNA	10
1. Antybiotyki cefalosporynowe	11
1.1. Odkrycie cefalosporyn	11
1.2. Struktura chemiczna cefalosporyn	12
1.3. Mechanizm działania cefalosporyn	13
1.4. Klasyfikacja cefalosporyn	14
2. Ceftazydym	17
2.1. Charakterystyka fizyko-chemiczna	17
2.2. Struktura chemiczna a aktywność przeciwdrobnoustrojowa ceftazydymu	18
2.3. Spektrum działania	19
2.4. Farmakokinetyka	20
2.5. Zastosowanie kliniczne	21
2.6. Zastosowanie i znaczenie ceftazydymu w leczeniu bakteryjnych zakażeń oczu	22
2.7. Preparaty handlowe ceftazydymu	27
2.8. Preparat Biotum	28
2.9. Trwałość ceftazydymu w roztworach wodnych	29
2.9.1. Mechanizm rozkładu ceftazydymu	29
2.9.2. Trwałość ceftazydymu w roztworach wodnych do podawania parenteralnego	31
2.9.3. Trwałość ceftazydymu w kroplach do oczu, wpływ czynników fizykochemicznych oraz substancji pomocniczych	34
3. Pirydyna – toksyczny produkt rozkładu ceftazydymu	37
3.1. Struktura i właściwości chemiczne	37
3.2. Metabolizm pirydyny	38
3.3. Toksyczność pirydyny	38
4. Charakterystyka substancji pomocniczych użytych w technologii kropli do oczu z ceftazydymem	40
4.1. Bufor cytrynianowy	40
4.2. Boran fenylortęciowy	41
4.3. Alkohol β-feniloetylowy	42
4.4. Alkohol poliwinylowy	43

III CEL PRACY	44
IV CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	46
1. Materiał do badań.....	47
2. Odczynniki do badań.....	48
3. Sprzęt i aparatura.....	50
4. Sporządzenie i ocena fizykochemiczna roztworów substancji pomocniczych, zastosowanych w technologii kropli do oczu z ceftazydymem.....	53
4.1. Bufory cytrynianowe.....	53
4.2. Roztwór alkoholu poliwinylowego.....	54
4.3. Środki konserwujące.....	55
4.3.1. Roztwór boranu fenylortęciowego.....	55
4.3.2. Alkohol β -fenyloetylowy.....	55
5. Badanie zgodności farmaceutycznej 5% roztworów ceftazydymu z substancjami pomocznymi zastosowanymi w składzie kropli.....	56
6. Skład, sporządzenie, ocena fizykochemiczna oraz ocena skuteczności przeciwdrobnoustrojowej rozpuszczalników do 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”.....	57
6.1. Skład rozpuszczalników do 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”.....	57
6.2. Metoda sporządzania rozpuszczalników do 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”.....	59
6.3. Ocena jakościowa rozpuszczalników do 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”.....	60
6.4. Ocena skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej rozpuszczalników do kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”.....	64
7. Czynności przygotowawcze do pracy w warunkach aseptycznych.....	68
7.1. Substancja czynna.....	68
7.2. Roztwory substancji pomocniczych.....	68
7.3. Przygotowanie sprzętu.....	68
7.4. Łoża do pracy aseptycznej.....	69
8. Roztwory wodne oraz krople do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych, skład, sporządzenie.....	70
8.1. Skład recepturowy roztworów wodnych i kropli do oczu z ceftazydymem.....	70
8.2. Uzasadnienie składu recepturowego wodnych roztworów i kropli do oczu z ceftazydymem.....	72
8.3. Tok postępowania przy sporządzaniu roztworów wodnych oraz kropli do oczu z ceftazydymem.....	73

9.	Krople do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, skład, sporządzanie	76
9.1.	Skład 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”	76
9.2.	Tok postępowania przy sporządzaniu kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”	76
10.	Ocena fizyczna 1% i 5% roztworów wodnych i kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych i „przemysłowych”	78
10.1.	Tożsamość	78
10.2.	pH kropli	79
10.3.	Ciśnienie osmotyczne	84
10.4.	Lepkość	89
10.5.	Badania organoleptyczne	91
11.	Analiza zmian zawartości ceftazydymu w 1% i 5% roztworach wodnych oraz kroplach do oczu w wersjach recepturowych i „przemysłowych”, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C	93
11.1.	Warunki rozdziału chromatograficznego	93
11.2.	Sporządzenie fazy ruchomej	94
11.3.	Analiza ilościowa ceftazydymu – metoda wzorca zewnętrznego	95
11.4.	Statystyczna analiza regresji	99
11.5.	Walidacja metody ilościowego oznaczania ceftazydymu w roztworach wodnych oraz kroplach do oczu	101
11.5.1.	Oznaczenie zawartości ceftazydymu w preparacie Biotum	101
11.5.2.	Specyficzność	102
11.5.3.	Liniowość metody oznaczania ilościowego ceftazydymu	109
11.5.4.	Granice wykrywalności i oznaczalności ceftazydymu	109
11.5.5.	Dokładność	110
11.5.6.	Precyzja	113
11.5.7.	Robustness	113
11.6.	Analiza zmian zawartości ceftazydymu w 1% i 5% roztworach wodnych oraz kroplach do oczu w wersjach recepturowych i „przemysłowych”, tok postępowania analitycznego, wyniki	114
11.6.1.	Materiał do badań	114
11.6.2.	Czas trwania badań	114
11.6.3.	Przygotowanie prób i przeprowadzenie analizy	115
11.6.4.	Zawartość ceftazydymu w badanym materiale	123
12.	Analiza stężenia pirydyny w kroplach do oczu z ceftazydymem	147
12.1.	Warunki rozdziału chromatograficznego	147
12.2.	Analiza roztworów wzorcowych pirydyny, wykreślenie krzywych kalibracyjnych	147
12.3.	Statystyczna analiza regresji	148

12.4. Walidacja metody ilościowego oznaczania pirydyny w roztworach wodnych oraz kroplach do oczu	152
12.4.1. Specyficzność.....	152
12.4.2. Liniowość metody oznaczania ilościowego pirydyny.....	152
12.4.3. Granice wykrywalności i oznaczalności pirydyny	152
12.4.4. Dokładność.....	153
12.4.5. Precyzja	156
12.4.6. Zawartość pirydyny w badanym materiale.....	156
V OMÓWIENIE WYNIKÓW.....	161
VI WNIOSKI.....	194
VII STRESZCZENIE.....	197
VII SUMMARY	201
VIII PIŚMIENNICTWO	205
IX SPIS TABEL	216
X SPIS RYCIN.....	221

I WSTĘP

W leczeniu bakteryjnych zakażeń narządu wzroku jako leki pierwszego rzutu stosowane są obecnie antybiotyki aminoglikozydowe. Powodują one jednak szereg działań niepożądanych oraz częste reakcje alergiczne. Obserwuje się także znaczną oporność bakterii na tę grupę antybiotyków. Wskazuje to na potrzebę opracowania nowej okulistycznej postaci leku do stosowania miejscowego, zawierającej antybiotyk nowszej generacji.

Ceftazydym, cefalosporyna III generacji, charakteryzuje się szerokim spektrum przeciwdrobnoustrojowym ze szczególną aktywnością wobec bakterii Gram-ujemnych, między innymi wobec *Pseudomonas aeruginosa*. Ceftazydym nie ustępuje skutecznością aminoglikozydom, jest natomiast od nich znacznie mniej toksyczny. Wykazuje ponadto oporność na działanie klasycznych β -laktamaz. Pomimo znakomitych właściwości przeciwdrobnoustrojowych ceftazydymu i jego niskiej toksyczności względem tkanek oka, na światowym rynku farmaceutycznym brakuje okulistycznej postaci leku z ceftazydymem do stosowania miejscowego. Główną przyczyną tego stanu rzeczy jest niska trwałość tego antybiotyku w roztworach wodnych. Niniejsza praca jest odpowiedzią na realne zapotrzebowanie kliniczne na preparat z ceftazydymem w postaci kropli do oczu o trwałości umożliwiającej przeprowadzenie pełnej miejscowej antybiotykoterapii.

W 1999 r. pod kierownictwem dr hab. n. farm. Anny Kodym rozpoczęto w Katedrze i Zakładzie Technologii Postaci Leku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu badania dotyczące zastosowania antybiotyków cefalosporynowych w kroplach do oczu. Wyniki powyższych badań pozwoliły między innymi na opatentowanie pełnej technologii sporządzania 1% recepturowych kropli do oczu z ceftazydymem, obejmującej dobór odpowiednich substancji pomocniczych, metodykę sporządzania oraz fizyczną i mikrobiologiczną ocenę trwałości kropli. Badania nad technologią 1% recepturowych kropli do oczu z antybiotykami cefalosporynowymi stały się przedmiotem rozprawy doktorskiej dr farm. Tomasza Zawiszy, pt. „Technologia kropli do oczu z cefazoliną, cefuroksymem i ceftazydymem”.

W niniejszej pracy, która jest kontynuacją badań zapoczątkowanych w Poznaniu, zaprojektowano dodatkowe formułacje dla 5% kropli recepturowych, a także dokonano fizykochemicznej oceny trwałości 1% i 5% kropli recepturowych. Na podstawie pozytywnych wyników badań wersji recepturowych, zaprojektowano składy rozpuszczalników „przemysłowych” dla handlowych wersji kropli do oczu z ceftazydymem oraz potwierdzono ich odpowiednią trwałość fizykochemiczną. W analizie trwałości chemicznej ceftazydymu w kroplach do oczu zastosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

II CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Antybiotyki cefalosporynowe

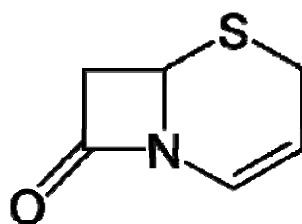
1.1. Odkrycie cefalosporyn

Cefalosporyny, które do lecznictwa wprowadzono w latach 60-tych XX wieku, należą do grupy antybiotyków β -laktamowych, wyprowadzonych z naturalnej cefalosporyny C. Prekursory cefalosporyn po raz pierwszy zostały wyizolowane w 1948 r. przez włoskiego naukowca Giuseppe Brotzu, kierownika Wydziału Higieny Uniwersytetu w Cagliari na Sardynii. Zaobserwował on, że mieszkańcy jego rodzinnego miasta Cagliari, korzystający z wody morskiej z zatoki, do której spływały miejskie ścieki, nie chorowali na występujący endemicznie na Sardynii dur brzuszny. Ponadto zauważył okresowe oczyszczanie się wód w pobliżu ujścia ścieków odprowadzanych z wyspy. Profesor Brotzu doszedł do wniosku, że w zatoce muszą żyć drobnoustroje produkujące antybiotyk. Z wody pochodzącej z tych okolic wyizolował pleśń *Cephalosporium acremonium*, z której wyciąg okazał się aktywny wobec bakterii wywołujących między innymi salmonellozy, dżumę czy cholere.

Pomimo obiecujących wyników prowadzonych badań, profesor Brotzu nie uzyskał wsparcia finansowego od władz włoskich (mimo nominacji do Nagrody Nobla) i wyizolowane szczepy *Cephalosporium acremonium* przekazał do dalszych badań lordowi Howardowi Florey'owi, profesorowi patologii Uniwersytetu w Oksfordzie. Zespół naukowców powołany przez Florey'a wyodrębnił początkowo cefalosporynę P o strukturze steroidowej i cefalosporynę N. Nadmienić należy, że żadna z naturalnych cefalosporyn nie znalazła zastosowania klinicznego. W 1953 roku wyizolowano trzecią aktywną substancję, cefalosporynę C, która okazała się oporna na β -laktamazy, ale nie miała wystarczającej stabilności dla zastosowań klinicznych. Wydarzenie to zapoczątkowało cały łańcuch badań nad możliwością uzyskania czystego pierścienia cefalosporynowego (kwasu 7-aminocefalosporanowego, 7-ACA) a następnie jego modyfikacji, co umożliwiłoby syntezę dalszych leków. Pierwszą cefalosporynę, cefalotynę, zsyntetyzowano dopiero w 1961 roku, co dało początek dalszym odkryciom i produkcji cefalosporyn na skalę przemysłową [1-7].

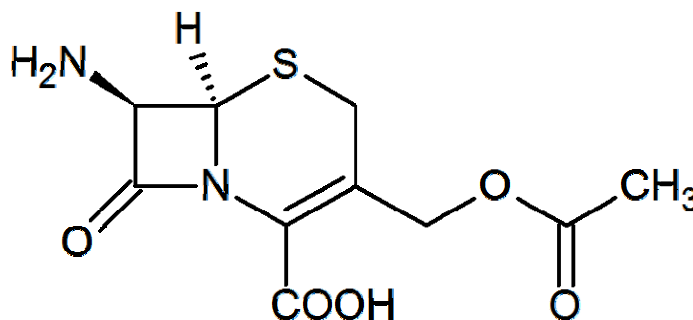
1.2. Struktura chemiczna cefalosporyn

Podstawą szkieletu antybiotyków cefalosporynowych jest układ cefemu (Ryc. 1.), zawierający 4-członowy pierścień β -laktamowy połączony z 6-członowym pierścieniem dihydrotiazyny. Cefem wykazuje większą oporność na działanie β -laktamaz niż penam, występujący w penicylinach, co sprawia, że ta grupa antybiotyków charakteryzuje się szerszym spektrum działania antibakteryjnego.



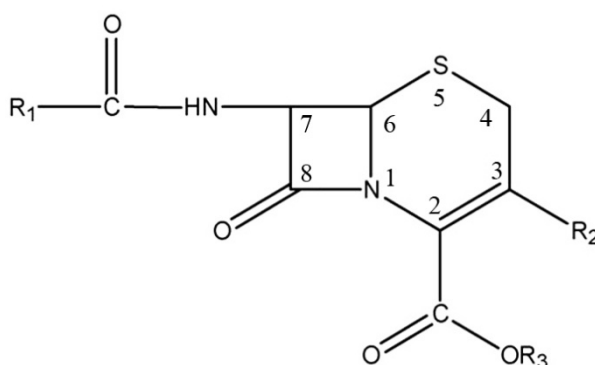
Ryc. 1. Struktura cefemu

Cefalosporyny są pochodnymi kwasu 7- aminocefalosporanowego (7-ACA) (Ryc. 2.). Poprzez odpowiedni dobór podstawników w 7-ACA można wpływać na trwałość chemiczną, farmakokinetykę, aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz oporność na β -laktamazy jego pochodnych.



Ryc. 2. Kwas 7- aminocefalosporanowy

Modyfikacje 7-ACA dotyczą głównie podstawników w łańcuchach bocznych R₁ (przy węglu C-7) oraz R₂ (przy węglu C-3) (Ryc. 3). Podstawniki w pozycji R₁ zwiększają oporność leku na działanie β-laktamaz, co prowadzi do wzrostu aktywności i rozszerzenia spektrum przeciwbakteryjnego antybiotyku. Przykładem tak otrzymanych cefalosporyn są: cefuroksym, cefotaksym, ceftyzoksym, ceftriakson, ceftazydym a także cefamycyny. Cefamycyny posiadają dodatkowo grupę 7-metoksyłową (grupa – OCH₃ przy C-7), która warunkuje ich zwiększoną aktywność wobec bakterii beztlenowych. Obecność wiązania podwójnego pomiędzy węglami C-2 i C-3 oraz podstawnika R₂ stabilizują dodatkowo wiązanie β-laktamowe w pierścieniu. Zmiany w łańcuchu R₂ mogą wpływać na wydłużenie okresu biologicznego półtrwania leku w osoczu. Właściwości takie posiadają na przykład: cefazolina, cefamandol, cefonicyd, cefoperazon, ceftriakson i ceftazydym. Podstawnik R₃, zwiększając lipofilność leku, poprawia jego biodostępność. Szczególna aktywność ceftazydymu wobec *Pseudomonas aeruginosa* wynika z obecności w strukturze jego cząsteczki grupy propylokarboksylowej w bocznym łańcuchu amino-tiazolilo-1alfa-oksoiminowym [8-11].



Ryc. 3. Wzór ogólny półsyntetycznych cefalosporyn

1.3. Mechanizm działania cefalosporyn

Mechanizm działania cefalosporyn, podobnie jak wszystkich antybiotyków β-laktamowych, polega na hamowaniu syntezy mureiny, głównego składnika ściany komórkowej bakterii. Mureina jest peptydoglikanem, zbudowanym z ułożonych naprzemiennie jednostek kwasu N-acetylmuraminowego i N-acetyloglukozaminy, połączonych wiązaniem β-(1, 4) glikozydowym. Dzięki obecności grupy mleczanowej

przy C-3 w kwasie N-acetylmuraminowym dochodzi do przyłączenia bocznych łańcuchów peptydowych, co skutkuje sieciowaniem łańcuchów glikanowych. Powstaje wówczas polimerowa struktura polisacharydowo-peptydowa, która zapewnia komórce bakteryjnej znaczną wytrzymałość i sztywność. W procesie sieciowania struktury peptydoglikanu bierze udział enzym transpeptydaza, który łączy dwa boczne łańcuchy peptydowe sąsiadujących łańcuchów glikanowych. Antybiotyki cefalosporynowe wiążą się kowalencyjnie z seryną w miejscu aktywnym tego enzymu, hamując w ten sposób jego aktywność. Zmieniają także aktywność innych enzymów: endopeptydazy i karboksypeptydazy, biorących udział w tworzeniu cząsteczek mureiny. Enzymy te umiejscowione są w błonie komórkowej bakterii i noszą nazwę białek wiążących penicyliny (PBP). Zablokowanie aktywności enzymatycznej PBP w komórce bakterii zatrzymuje jej dalszy wzrost. Dochodzi do aktywacji autolizyn (hydrolaz) komórkowych, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki bakteryjnej [9, 12-14].

1.4. Klasyfikacja cefalosporyn

Grupa cefalosporyn jest bardzo liczna i zróżnicowana. Poszczególne związki różnią się przede wszystkim właściwościami farmakokinetycznymi i stopniem wiązania z białkami. Znaczne różnice dotyczą także zakresu działania przeciwbakteryjnego. Można wyróżnić cztery podstawowe generacje cefalosporyn. Różnice pomiędzy poszczególnymi generacjami dotyczą spektrum przeciwbakteryjnego, farmakokinetyki oraz oporności na β -laktamazy [9-10].

Cefalosporyny I generacji:

- ❖ wykazują większą aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich niż Gram-ujemnych,
- ❖ są wrażliwe na β -laktamazy,
- ❖ nie są aktywne wobec *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*, *Salmonella* i indolo-dodatnich szczepów *Proteus*,
- ❖ słabo przenikają do płynu mózgowo-rdzeniowego.
 - doustne: cefaleksyna, cefradyna, cefadroksyl
 - parenteralne: cefazolina, cefradyna, cefalorydyna

Cefalosporyny II generacji:

- ❖ wykazują większą aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych niż Gram-dodatnich,
- ❖ są odporne na β -laktamazy typu TEM, SHV,
- ❖ nie wykazują aktywności wobec beztlenowców i *Pseudomonas aeruginosa*, są natomiast aktywne wobec *Proteus*.
 - doustne: cefaklor, aksetyl cefuroksymu, cefprozil
 - parenteralne: cefamandol, cefuroksym, cefoksytyna

Cefalosporyny III generacji:

- ❖ wykazują większą niż II generacja aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych, natomiast mniejszą niż I generacja aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich,
- ❖ wykazują oporność na β -laktamazy typu TEM, SHV,
- ❖ niektóre są skuteczne wobec *Pseudomonas aeruginosa* (ceftazydym, cefoperazon),
- ❖ przenikają przez barierę krew-mózg, dzięki czemu są skuteczne w leczeniu zapalenia opon mózgowych.
 - doustne: cefiksym, ceftibuten, cefpodoksym
 - parenteralne: cefotaksym, ceftriakson, ceftazydym, cefoperazon

Cefalosporyny IV generacji:

- ❖ charakteryzują się bardzo szerokim spektrum działania, ze szczególną aktywnością wobec bakterii Gram-ujemnych,
- ❖ wykazują znaczną oporność na hydrolityczne działanie β -laktamaz (TEM, SHV, cefalosporynaza AmpC, β -laktamaza o poszerzonym spektrum ES β L),
- ❖ przenikają do płynu mózgowo-rdzeniowego.
 - tylko parenteralne: cefepim, cefpirom

Cefalosporyny V generacji:

- ❖ nieoficjalna nazwa cefalosporyn aktywnych wobec metycylinoopornych gronkowców; należą do nich dwa antybiotyki: ceftobiprol, ceftarolina, będące w trakcie procedur rejestracyjnych.

Podział cefalosporyn na generacje wynika z kolejności wprowadzania ich do lecznictwa. Obecnie najbardziej przydatnym podziałem tej grupy antybiotyków jest podział zaproponowany w 1987 roku przez Williamsa, choć w oryginalnej wersji niewystarczający. Jego podstawą jest zróżnicowana aktywność leków, wrażliwość na β -laktamazy oraz farmakokinetyka [15-16]. Williams wyróżnia pięć grup cefalosporyn:

Grupa 0:

Cefalosporyny doustne, które dobrze wchłaniają się z przewodu pokarmowego, aktywne głównie wobec bakterii Gram-dodatnich, w szczególności *Streptococcus sp.* i *Staphylococcus sp.* (cefalosporyny doustne I generacji, np.: cefadroksyl, cefaleksyna, cefradyna i II generacji, np.: cefaklor, cefprozil).

Grupa 1:

Cefalosporyny o wysokiej aktywności wobec drobnoustrojów Gram-dodatnich, odporne na β -laktamazy gronkowcowe (cefalosporyny I generacji podawane parenteralnie, np.: cefalotyna, cefazolina, cefapiryna).

Grupa 2:

Cefalosporyny charakteryzujące się zwiększoną opornością na β -laktamazy, obejmujące swoim spektrum *Haemophilus influenzae* oraz pałeczki *Enterobacteriaceae* (cefalosporyny II generacji, np.: cefamandol, cefuroksym, cefotiam i III generacji, np.: cefotaksym, ceftriakson).

Grupa 3:

Cefalosporyny o szerokim zakresie działania i wysokiej oporności na β -laktamazy. Stosowane w ciężkich i zagrażających życiu zakażeniach wywołanych przez *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae sp.*, *Haemophilus influenzae* oraz *Neisseria sp.*, a także bakteriami Gram-dodatnimi, w tym paciorkowcami i gronkowcami (cefalosporyny podawane pozajelitowo z III generacji, np.: ceftazydym, cefoperazon oraz z IV generacji, np. cefepim).

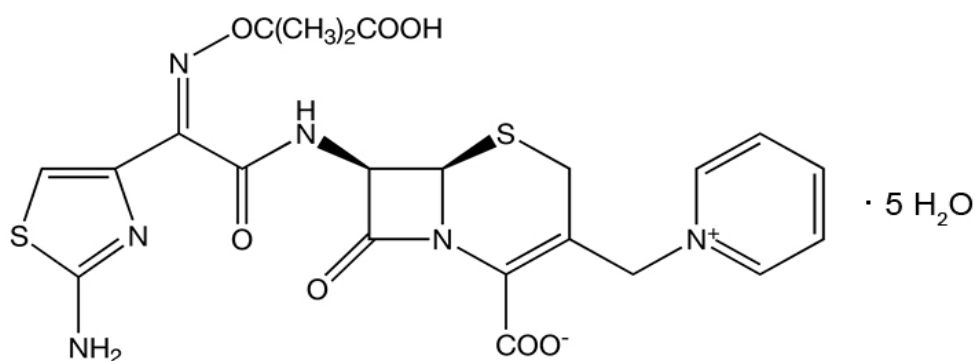
Grupa 4:

Cefalosporyny o stosunkowo wąskim spektrum działania, ale bardzo odporne na β -laktamazy. Charakteryzują się wysoką aktywnością wobec szczepów *Bacteroides fragilis* (cefamycyny, należące do II generacji: cefmetazol, cefotetan i cefoksytyna).

2. Ceftazydym

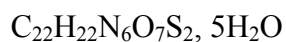
Ceftazydym jest antybiotykiem cefalosporynowym, należącym do III generacji i do grupy 3 wg Williamsa, o szczególnej aktywności wobec *Pseudomonas aeruginosa*. Antybiotyk ten nie wchłania się z przewodu pokarmowego i przeznaczony jest wyłącznie do podawania parenteralnego. Podobnie jak inne cefalosporyny działa bakteriobójczo poprzez hamowanie syntezy ściany komórkowej [12]. Ze względu na wysoką aktywność wobec *Pseudomonas aeruginosa* i pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*, jest stosowany w leczeniu ciężkich zakażeń bakteryjnych, szczególnie zakażeń szpitalnych. Znajduje szerokie zastosowanie w leczeniu chorych z obniżoną odpornością oraz pacjentów z oddziałów intensywnej opieki medycznej [17]. W lecznictwie stosowany w postaci pięciowodzianu.

2.1. Charakterystyka fizyko-chemiczna



Ryc. 4. Wzór strukturalny pięciowodzianu ceftazydymu

Wzór sumaryczny



Nazwa chemiczna FP VII

(6R,7R)-7-[[[Z]-2-(2-aminotiazol-4-ilo)-2-[(1-karboksy-1-metyloetoksy)imino]acetylo]amino]-8-okso-3-[(1-pirydynio)metylo]-5-tia-1-azabicyklo[4.2.0]okt-2-eno-2-karboksylan (sól wewnętrzna), pięciowodny

Postać i właściwości [18]

- ❖ biały lub prawie biały krystaliczny proszek,
- ❖ trudno rozpuszczalny w wodzie i metanolu, praktycznie nierozpuszczalny w acetonie i etanolu (96%),
- ❖ roztwór wodny wykazuje pH od 3,0 do 4,0.

2.2. Struktura chemiczna a aktywność przeciwdrobnoustrojowa ceftazydymu

Charakterystyczne właściwości przeciwdrobnoustrojowe ceftazydymu wynikają z obecności w jego cząsteczce następujących ugrupowań [8-9, 19]:

- ❖ IV-rzędowego ugrupowania amoniowego w pozycji C-3 i ujemnie naładowanej grupy COO^- , co nadaje cząsteczce leku charakter jonu obojnaczego i powoduje lepszą penetrację przez błony bakteryjne,
- ❖ układu aminotiazolu w reszcie acylowej, który nasila aktywność ceftazydymu wobec bakterii Gram-ujemnych,
- ❖ ugrupowania iminoalkoksyloвого w pozycji *syn*, dzięki czemu zwiększona jest oporność ceftazydymu na β -laktamazy (należy zaznaczyć, że *anty*- izomery nie mają aktywności przeciwbakteryjnej z powodu niewielkiego powinowactwa do PBP bakterii),
- ❖ grupy propylokarboksylowej, przyłączonej do bocznego łańcucha amino-tiazolilo-1alfa-oksoiminowego, która warunkuje dużą aktywność w stosunku do *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter*,
- ❖ podstawnika pirydyniowego przy węglu C-3, który warunkuje lepszy dostęp antybiotyku do komórki bakteryjnej oraz zwiększa aktywność wobec bakterii, które nie produkują β -laktamaz.

2.3. Spektrum działania [9, 12, 17, 20-24]

Szerokie spektrum działania przeciwbakteryjnego ceftazydymu wynika z jego znacznej oporności na działanie klasycznych β -laktamaz, syntetyzowanych przez bakterie Gram-ujemne. Ceftazydym wykazuje aktywność wobec drobnoustrojów opornych na cefalosporyny starszych generacji. Działa głównie na bakterie Gram-ujemne, także szczepy oporne na gentamycynę i inne antybiotyki aminoglikozydowe. Ceftazydym należy do najskuteczniejszych terapeutycznie antybiotyków z grupy cefalosporyn w leczeniu zakażeń wywołanych pałeczką ropy błękitnej. Siła działania w stosunku do *Pseudomonas aeruginosa* jest wyższa niż tikarcyliny oraz piperacyliny, określanej często jako penicylina *anty-Pseudomonas*, a także imipenemu. W trakcie leczenia może jednak narastać oporność bakterii na ceftazydym.

❖ Gram-ujemne tlenowce

Ceftazydym wykazuje bardzo dużą aktywność wobec: *Acinetobacter sp.*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catharrhalis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii*, *Serratia sp.* Jest aktywny również wobec *Salmonella*, *Shigella* i *Neisseria*. Ceftazydym działa synergistycznie z aminoglikozydami w stosunku do *Pseudomonas aeruginosa* i bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*.

❖ Gram-dodatnie tlenowce

Spośród drobnoustrojów Gram-dodatnich - ceftazydym wykazuje największą aktywność wobec paciorkowców. Działa na *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*. Jest aktywny wobec *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, włączając szczepy wytwarzające i nie wytwarzające penicylinazy, chociaż siła działania jest znacznie mniejsza niż cefalosporyn starszych generacji. Nie działa na szczepy gronkowców metycylinooporne.

❖ Beztlenowce

W grupie beztlenowców wrażliwość na ceftazydym wykazują rodzaje: *Peptococcus sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Clostridium sp.* (z wyjątkiem *Clostridium difficile*), *Bacteroides* (z wyjątkiem *Bacteroides fragilis*).

2.4. Farmakokinetyka

Ceftazydym należy do cefalosporyn podawanych wyłącznie pozajelitowo, ponieważ nie ulega wchłanianiu z przewodu pokarmowego. Po podaniu pozajelitowym bardzo szybko uzyskuje wysokie stężenie w osoczu. Wykazano, że po godzinie od wstrzyknięcia domięśniowo ceftazydymu w dawce 500 mg antybiotyk ten osiąga stężenie w osoczu nie mniejsze niż 20 mg/l. Natomiast po 5 minutach od podania dożylnego notowano stężenia ceftazydymu w osoczu w granicach 45 mg/l. Stopień wiązania ceftazydymu z białkami oznaczono na poziomie 17-18,7%. Objętość dystrybucji wynosi przeciętnie 0,23–0,28 ml/kg masy ciała. Okres biologicznego półtrwania po podaniu dożylnym lub domięśniowym mieści się w granicach 1,5 - 2 godziny [1, 25-30].

Ceftazydym bardzo dobrze penetruje do tkanek, narządów i płynów ustrojowych. Przenika przez łożysko i do mleka matki. Uzyskuje wysokie stężenia w żółci, kościach, sercu, narządach rozrodczych. W stanie zapalnym opon mózgowo-rdzeniowych doskonale penetruje przez barierę krew-mózg. W płynie opłucnowym, otrzewnowym, mózgowo-rdzeniowym, ucha środkowego, stawowym - osiąga ok. 50% stężenia notowanego w surowicy krwi [1, 12, 24]. Przenikanie ceftazydymu przez barierę krew-ciecz wodnista oka jest znacznie wyższe przy istniejącym stanie zapalnym narządu wzroku. Odnotowano 2-6-krotnie wyższą dostępność ceftazydymu do ciała szklistego po podaniu dożylnym lub domięśniowym (badania z udziałem zwierząt - króliki) w przypadku oka zakażonego (*Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Haemophilus sp.*) niż w przypadku oka zdrowego. Osiągane stężenia ceftazydymu w ciele szklistym były wyższe niż wartości MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) dla zastosowanych w badaniach drobnoustrojów [31-35].

Ceftazydym nie ulega przemianom metabolicznym w ustroju. Wydalany jest w formie niezmienionej, niemal wyłącznie przez nerki, głównie w wyniku przesączania kłębuszkowego, w mniejszym stopniu na drodze wydzielania kanalikowego. Około 90% podanej dawki pojawia się w moczu w ciągu pierwszej doby. Z powodu tej drogi eliminacji - w przypadkach zmniejszonej filtracji kłębuszkowej okres półtrwania ceftazydymu znacznie się wydłuża: z 1,6 godziny u osób z prawidłową czynnością nerek do 5 godzin u chorych dializowanych, a nawet do 24,6 godziny u osób z ciężką niewydolnością nerek [26-30].

2.5. Zastosowanie kliniczne

Ceftazydym, ze względu na szczególną aktywność wobec *Pseudomonas aeruginosa*, powinien być zarezerwowany przede wszystkim dla sytuacji klinicznych z podejrzeniem lub potwierdzeniem zakażenia tym drobnoustrojem. W terapii celowanej ceftazydym jest lekiem z wyboru w leczeniu zakażeń o etiologii *Pseudomonas aeruginosa*. Podejmując decyzję o zastosowaniu ceftazydymu jako leku z wyboru w terapii empirycznej, należy wziąć pod uwagę spektrum jego działania przeciwbakteryjnego, obejmujące głównie tlenowe bakterie Gram-ujemne.

Ceftazydym jest szczególnie ważnym antybiotykiem w terapii chorych z obniżoną odpornością immunologiczną oraz u pacjentów leczonych w oddziałach intensywnej opieki medycznej. Ceftazydym może być stosowany w leczeniu gorączkujących pacjentów z neutropenią, u których gorączka jest przypuszczalnie wywołana zakażeniem bakteryjnym. Ze względu na duże ryzyko występowania zakażeń w tej grupie pacjentów, wymagana jest natychmiastowa empiryczna terapia przeciwbakteryjna w momencie pierwszych objawów infekcji. Podstawowym schematem antybiotykoterapii jest tu stosowanie antybiotyków β -laktamowych w skojarzeniu z aminoglikozydami, np. ceftazydymu z amikacyną lub tobramycyną, lub ceftazydymu z fluorochinolonami, np. z lewofloksacyną [36-39]. Ze względu na rosnącą w ostatnich latach ilość szczepów Gram-dodatnich, będących przyczyną zakażeń szpitalnych, wprowadza się również inne schematy terapii [40].

Ceftazydym, jako szerokowachlarzowa cefalosporyna III generacji, stosowany jest w wielu poważnych, wywołanych głównie przez bakterie Gram-ujemne, zagrażających życiu infekcjach, wśród których można wymienić: ciężkie szpitalne zapalenia płuc, zakażenia dolnych dróg oddechowych u pacjentów z mukowiscydozą, powikłane zakażenia skóry i tkanek miękkich, posocznice, w tym posocznice noworodków, powikłane zakażenia dróg moczowych, zakażenia kości i stawów, bakteryjne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zakażenia jamy brzusznej (w połączeniu z lekiem działającym na bakterie beztlenowe), przewlekłe ropne zakażenie ucha środkowego, złośliwe zapalenie ucha zewnętrznego, zakażenia ran, w tym ran oparzeniowych [9, 12, 17, 36, 41-43]. Ceftazydym stosowany jest także w postaci wstrzyknięć dożylnych lub do ciała szklistego w leczeniu pooperacyjnych, endogennych zakażeń bakteriami Gram-ujemnymi wnętrza gałki ocznej o ciężkim przebiegu [34-35, 44-46]. Ceftazydym stosowany jest wyłącznie w lecnictwie zamkniętym.

2.6. Zastosowanie i znaczenie ceftazydymu w leczeniu bakteryjnych zakażeń oczu

Bakteryjne infekcje narządu wzroku mogą być bardzo groźne w skutkach i prowadzić do nieodwracalnych zmian w tkankach oczodołu i oka. Infekcja może dotyczyć każdego odcinka narządu wzroku. Może być endogenna - wywołana przez saprofityczną florę bakteryjną, np. przez *Staphylococcus epidermidis*, lub egzogenna - spowodowana zainfekowaniem bakteriami ze środowiska zewnętrznego. Patogenami zakażeń okulistycznych są najczęściej ziarenkowce Gram-dodatnie, głównie *Staphylococcus aureus* oraz pałeczki Gram-ujemne, szczególnie niebezpieczna *Pseudomonas aeruginosa*, a także drobnoustroje z rodzaju *Serratia*, *Proteus*, *Enterobacter* i *Klebsiella* oraz *Escherichia coli* [47-48].

Schemat leczenia bakteryjnych zakażeń narządu wzroku polega na początkowym leczeniu empirycznym antybiotykami o szerokim spektrum działania. W przypadkach ostrych infekcji, lub gdy leczenie empiryczne nie przynosi oczekiwanych rezultatów, należy wykonać antybiogram w celu identyfikacji i określenia wrażliwości drobnoustroju.

Leki przeciwbakteryjne w leczeniu zakażeń narządu wzroku stosuje się ogólnie lub miejscowo. Podanie ogólne ma zastosowanie przede wszystkim w przypadku zakażeń okołogałkowych. Siatkówka i błona naczyniowa są dobrze ukrwione. Bariera krew-siatkówka w stanie zapalnym staje się bardziej przepuszczalna dla podawanych ogólnie leków. Leczenie miejscowe pozwala natomiast na uniknięcie wielu ogólnoustrojowych działań ubocznych (toksyczność antybiotyków, zaburzenie mikroflory organizmu, powstawanie szczepów opornych). Miejscowe podanie antybiotyków ma zastosowanie głównie w infekcjach przednich struktur oka – spojówki i rogówki. Lek podaje się najczęściej w formie kropli lub maści. Krople oczne podaje się do worka spojówkowego lub na rogówkę. Stężenie terapeutyczne leku uzyskuje się tylko w przednim odcinku oka. Aby przedłużyć kontakt z rogówką wskazane jest stosowanie kropli o zwiększonej lepkości. W przebiegu ciężkich owrzodzeń rogówki i zapalenia wnętrza gałki ocznej stosuje się wstrzyknięcia podspojówkowe lub dokomorowe. Pozwalają one na szybkie uzyskanie wyższego stężenia leku niż po podaniu miejscowym [47-50].

Bakteryjne zakażenie wnętrza gałki ocznej jest najbardziej niebezpiecznym okulistycznym powikłaniem pourazowym lub pozabiegowym, które może doprowadzić do utraty wzroku, a nawet konieczności usunięcia oka. Konieczna jest natychmiastowa

terapia przeciwbakteryjna [35, 51-52]. Najczęściej stosowaną grupą antybiotyków są antybiotyki aminoglikozydowe, których spektrum zapewnia doskonale działanie wobec bakterii Gram-ujemnych. Aminoglikozydy podawane są przede wszystkim ogólnie oraz w postaci iniekcji dokomorowych. Powodują one jednak wiele działań niepożądanych, szczególnie po podaniu ogólnym, z których należy wymienić między innymi ototoksyczność, nefrotoksyczność, działanie depresyjne na serce [13, 53-56]. Antybiotyki aminoglikozydowe, w szczególności gentamycyna, należą do najbardziej toksycznych antybiotyków stosowanych w okulistyce. Działają toksycznie na siatkówkę i jej nabłonek barwnikowy, powodują miopatie mięśni gałki ocznej. W przypadku nadwrażliwości na tę grupę antybiotyków mogą wystąpić reakcje alergiczne spojówek, płamica małopłytkowa, omamy. Odnotowano także (badania na zwierzętach) zmętnienie ciała szklistego i odwarstwienie siatkówki po wewnątrzgałkowym podaniu gentamycyny [57]. Szczególną ostrożność należy zachować przy podaniu aminoglikozydów w postaci okołooicznego wstrzyknięcia w leczeniu bądź profilaktyce infekcji [53, 58-63].

W większości przypadków antybiotyki aminoglikozydowe mogą być zastąpione przez ceftazydim. Charakteryzuje się on szerokim spektrum przeciwdrobnoustrojowym, szczególnie silne działanie wykazuje wobec bakterii Gram-ujemnych, między innymi wobec *Pseudomonas aeruginosa*. W leczeniu zakażenia wnętrza gałki ocznej ceftazydim może być podawany zarówno dożylnie jak i w postaci iniekcji dokomorowych. Skuteczność podania dożylnego jest możliwa dzięki zwiększeniu przepuszczalności bariery krew-ciecz wodnista przy istniejącym stanie zapalnym oka. Stężenie ceftazydymu w cieczy wodnistej oka po podaniu dożylnym jest wyższe niż minimalne stężenie hamujące (MIC) dla najczęstszych Gram-ujemnych i Gram-dodatnich patogenów powodujących zakażenia okulistyczne [64-66]. Jednakże w przypadku zakażenia wewnątrzgałkowego o etiologii *Staphylococcus aureus* imipenem okazał się bardziej efektywny od ceftazydymu skojarzonego z amikacyną, podanych w iniekcji dożylniej [67]. Stopień penetracji ceftazydymu do ciała szklistego po podaniu dożylnym jest wyższy niż gentamycyny, co odnotowano zarówno dla oka zdrowego jak i oka z urazem. Osiągnięte stężenia ceftazydymu w ciele szklistym były znacznie wyższe od wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) dla *Pseudomonas* i *Haemophilus sp.*, które nie zostało osiągnięte przez gentamycynę [32].

W przypadku bardzo ostrego i nie reagującego na standardową antybiotykoterapię zapalenia rogówki o etiologii *Pseudomonas aeruginosa* zastosowano dożylnie ceftazydym w skojarzeniu z acetazolamidem, podawanym doustnie. Zastosowanie acetazolamidu spowodowało znaczne zwiększenie penetracji ceftazydymu do komory przedniej oka. Osiągnięcie większego stężenia ceftazydymu w komorze przedniej przyspieszyło wyleczenie zakażenia [68].

Pomimo wysokiej dostępności dokomorowej ceftazydymu po podaniu dożylnym, znacznie częściej stosuje się iniekcje ceftazydymu bezpośrednio do ciała szklanego. Umożliwia to pominięcie naturalnej bariery krew-ciecz wodnista i osiągnięcie natychmiastowych wysokich stężeń antybiotyku w gałce ocznej. Iniekcje do ciała szklanego są obecnie standardową terapią przy bakteryjnym zakażeniu gałki ocznej a także jako ochrona przeciwbakteryjna podczas poważnych zabiegów chirurgicznych, np. podczas witrektomii. Dawka 2,25 mg ceftazydymu, podanego w postaci iniekcji do ciała szklanego, okazała się efektywna w zakażeniu wewnątrzgałkowym bakteriami Gram-ujemnymi oraz nie wykazała toksycznego działania w stosunku do siatkówki oka [69]. Prowadzone na przełomie ostatnich lat badania wykazały wysoką skuteczność ceftazydymu wobec patogenów, izolowanych najczęściej z zakażeń bakteryjnych gałki ocznej. Ceftazydym w postaci wstrzyknięcia dogałkowego osiąga stężenia powyżej MIC dla szczepów Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, będących najczęstszymi patogenami zakażeń wewnątrzgałkowych [44, 52, 65, 69-73].

Ceftazydym wykazuje większą skuteczność niż aminoglikozydy w leczeniu zakażeń bakteriami Gram-ujemnymi i w dawkach terapeutycznych wykazuje mniejsze działanie toksyczne na siatkówkę [31-33, 58, 64, 74-75]. Ceftazydym stosowany w trakcie i po zabiegu witrektomii nie wywołuje toksycznych efektów w stosunku do siatkówki oka [76], chociaż zaobserwowano zwiększenie toksyczności ceftazydymu pod wpływem oleju silikonowego, który zastosowano do wypełnienia gałki ocznej po zabiegu witrektomii [77].

Pomimo szerokiego spektrum przeciwdrobnoustrojowego ceftazydymu należy pamiętać, że jest on skuteczny głównie wobec bakterii Gram-ujemnych. Natomiast w empirycznym leczeniu zakażenia gałki ocznej należy zastosować natychmiastową, szerokowachlarzową antybiotykoterapię, pokrywającą zarówno Gram-ujemne jak i Gram-

dotądnie szczepy, które w ostatnich latach są coraz częściej izolowane jako patogeny zakażenia. Zgodnie ze schematami empirycznego leczenia zakażenia bakteryjnego gałki ocznej, aktualnie stosuje się iniekcje do ciała szklistego zawierające antybiotyki β -laktamowy: ceftazydym (pokrycie szczepów Gram-ujemnych) w skojarzeniu z antybiotykiem glikopeptydowym: wankomycyną (pokrycie szczepów Gram-dodatnich). Zamiast ceftazydymu może być zastosowana amikacyna, jednak tylko u pacjentów uczulonych na antybiotyki β -laktamowe, ze względu na toksyczność amikacyny. Najczęściej zalecane stężenia leków w podawanej iniekcji dokomorowej wynoszą dla ceftazydymu: 2,25 mg/0,1 ml, dla wankomycyny: 1 mg/0,1 ml, dla amikacyny: 0,4 mg/0,1 ml. Dodatkowo można zastosować miejscowo glikokortykosteroid, np. deksametazon. W przypadkach ostrych lub o gwałtownym przebiegu stosuje się również antybiotykoterapię ogólną. Schemat leczenia może być modyfikowany w zależności od etiologii i zaawansowania zakażenia [59, 74, 78-86].

Wankomycyna nie wywołuje toksycznego działania wobec struktur oka i może być bezpiecznie stosowana w skojarzeniu z ceftazydymem [87-88]. Odnotowano natomiast interakcję farmaceutyczną, polegającą na wytrącaniu osadu w przypadku zmieszania roztworów ceftazydymu i wankomycyny lub w przypadku jednoczesnego podania dokomorowego obu antybiotyków. Udowodniono jednak, że pomimo zachodzącej interakcji zachowana została aktywność przeciwdrobnoustrojowa antybiotyków, natomiast zaobserwowane zmętnienie cieczy wodnistej ustąpiło po 2 miesiącach od podania leków [88-92].

Ceftazydym jest wysoce aktywny wobec *Pseudomonas aeruginosa*, którego szczepy często wykazują oporność na antybiotyki, co czyni je jeszcze bardziej niebezpiecznym czynnikiem chorobotwórczym. *Pseudomonas aeruginosa* jest główną Gram-ujemną bakterią wywołującą zapalenie rogówki. Przyczynami zakażenia o tej etiologii mogą być: stosowanie soczewek kontaktowych, mechaniczne urazy rogówki, używanie wtórnie zanieczyszczonych leków okulistycznych, nieprawidłowości rogówki związane z keratopatią pęcherzową lub keratopatią na tle niedomykalności szpary powiekowej [48, 93]. Wykazano, że w ostatnich latach najczęstszym czynnikiem ryzyka wystąpienia zapalenia rogówki jest stosowanie soczewek kontaktowych, natomiast najczęściej izolowanym patogenem jest *Pseudomonas aeruginosa* [94-96].

Zakażenie o etiologii *Pseudomonas aeruginosa* charakteryzuje się przeważnie nagłym początkiem i gwałtownym przebiegiem. Badania w transmisyjnym mikroskopie elektronowym wykazały, że *Pseudomonas aeruginosa* może zainfekować rogówkę w ciągu 60 minut od momentu zetknięcia z uszkodzonym nabłonkiem [48]. W przeciągu 6-8 godzin wytwarza się szarawy, powierzchniowy naciek rogówki, a po kolejnych 18-24 godzinach nacieczenie rozszerza się obwodowo i w głąb oka, tworząc pierścień. W ciągu kolejnych 48-96 godzin, przy braku leczenia, postępuje martwica rozplywna twardówki i rogówki i pojawia się ropna wydzielina. Po 2-5 dniach następuje perforacja rogówki i zakażenie wnętrza gałki ocznej. Postępujące zaburzenia w krążeniu i odpływie cieczy wodnistej wywołują wtórne nadciśnienie wewnątrzgałkowe (jaskra wtórna), konsekwencją którego może być trwałe uszkodzenie nerwu wzrokowego [47]. Nielezione zakażenie pałeczką *Pseudomonas aeruginosa* zawsze prowadzi do perforacji rogówki i utraty wzroku.

Ze względu na szczególną aktywność ceftazydymu wobec *Pseudomonas aeruginosa* oraz oporność na klasyczne β -laktamazy, opracowanie technologii kropli do oczu z ceftazydymem może okazać się przełomowe w leczeniu ciężkich zakażeń przednich struktur oka. Krople z ceftazydymem mogą mieć zastosowanie w leczeniu ciężkich infekcji o gwałtownym przebiegu, wywołanych zwłaszcza przez bakterie Gram-ujemne: *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Acinetobacter* oraz przez wszystkie pałeczki Gram-ujemne z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Krople do oczu z ceftazydymem (50 mg/ml) w połączeniu z aminoglikozydem (gentamycyna lub tobramycyna, 1,4 mg/ml) wykazały skuteczność w leczeniu zakażenia rogówki pałeczką ropy błękitnej, nawet w przypadku szczepów opornych na aminoglikozydy [97-99]. Krople z ceftazydymem (50 mg/ml), zastosowane w połączeniu z wankomycyną (50 mg/ml), okazały się skuteczne w leczeniu bakteryjnego owrzodzenia rogówki [100]. Czas wyleczenia wyniósł 4 dni, podczas gdy leczenie zakażenia rogówki kroplami zawierającymi gentamycynę w połączeniu z cefazoliną wymagało 15-17 dni [101-102]. Wynika to z faktu, że główne patogeny zakażenia rogówki: *Staphylococcus aureus* oraz *Pseudomonas aeruginosa* wykazują większą wrażliwość na skojarzone leczenie ceftazydymem z wankomycyną. W miejscowym leczeniu zakażeń przednich struktur oka o etiologii *Pseudomonas aeruginosa*,

także w przypadku szczepów opornych na ciprofloksacynę, skuteczne jest również połączenie ceftazydymu (50 mg/ml) z tobramycyną (14 mg/ml) [103-104]. Stosuje się również połączenie terapii miejscowej i ogólnej, np. w przypadku martwiczego zakażenia rogówki zastosowano krople do oczu z ceftazydymem i doustnie imipenem [105], krople z ceftazydymem i krople z moksyflokscyną i doustnie prednizolon [106] a także monoterapię: wzmocnione (50 mg/ml) krople do oczu z ceftazydymem [96].

Brak na rynku farmaceutycznym gotowych preparatów z ceftazydymem w postaci kropli do oczu wynika z niskiej trwałości tego antybiotyku w roztworach wodnych. Krople do oczu z ceftazydymem przygotowywane są jedynie *ex tempore* w aptekach szpitalnych, wyłącznie na potrzeby pacjentów oddziałów okulistycznych. Zazwyczaj krople te wykonywane są przez rozpuszczenie parenteralnej postaci ceftazydymu w różnym vehiculum, np. w 0,9% roztworze NaCl lub w preparacie sztucznych łez [107-109].

2.7. Preparaty handlowe ceftazydymu

Ceftazydym należy do grupy cefalosporyn podawanych wyłącznie pozajelitowo. Preparaty handlowe ceftazydymu stanowią jałowy proszek przeznaczony do sporządzania roztworów do wstrzykiwań domięśniowych i dożylnych lub roztworów do infuzji. Obok antybiotyku zawierają w składzie dodatkowo jedną z dwóch substancji pomocniczych: bezwodny węglan sodu lub L-argininę, które ułatwiają rozpuszczenie ceftazydymu poprzez zmianę nierozpuszczalnej formy kwasowej ceftazydymu w rozpuszczalną sól.

Na świecie zarejestrowanych jest kilkadziesiąt preparatów zawierających ceftazydym. Aktualnie na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej dopuszczone są do obrotu następujące preparaty ceftazydymu [110]:

- ✓ **BIOTUM** (Bioton S.A., Polska)
proszek do sporządzania roztworu do wstrzykiwań, fiolki: 250 mg, 500 mg
proszek do sporządzania roztworu do wstrzykiwań lub infuzji, fiolki: 1 g, 2 g

- ✓ **CEFTAGEN** (Stragen Nordic / MITIM S.r.l., Włochy)
proszek do sporządzania roztworu do wstrzykiwań, fiolki: 250 mg, 500 mg, 1000 mg
proszek do sporządzania roztworu do infuzji, fiolki: 1 g, 2 g, 3 g

- ✓ **CEFTAZIDIME PFIZER** (Pfizer Service Co. BVBA, Francja / Pfizer PGM, Belgia)
proszek do sporządzania roztworu do wstrzykiwań, fiolki: 250 mg, 500 mg, 1 g, 2 g, 3 g

- ✓ **FORTUM** (GlaxoSmithKline; Włochy)
proszek do sporządzania roztworu do wstrzykiwań, fiolki: 250 mg, 500 mg
proszek do sporządzania roztworu do wstrzykiwań i infuzji, fiolki: 1 g, 2 g

- ✓ **MIROCEF** (Pliva Kraków, Polska)
proszek do sporządzania roztworu do wstrzykiwań, fiolki: 500 mg, 1 g
proszek do sporządzania roztworu do wstrzykiwań i infuzji, fiolki: 2 g

- ✓ **ZEFADYM** (Orchid Europe Limited, Wielka Brytania)
proszek do sporządzania roztworu do wstrzykiwań, fiolki: 1 g
proszek do sporządzania roztworu do infuzji, fiolki: 2 g

2.8. Preparat Biotum

Preparat Biotum stanowi mieszaninę pięciowodzianu ceftazydymu i węgla sodu [111-112] w postaci liofilizowanego proszku do sporządzania roztworów do wstrzykiwań lub wlewów. Węglan sodu dodawany jest do preparatu Biotum w ilości: 118 mg na 1 g ceftazydymu w celu przeprowadzenia w roztworze wodnym nierozpuszczalnej formy kwasowej ceftazydymu w postać rozpuszczalnej soli sodowej. W wyniku reakcji wymiany powstaje jako produkt uboczny CO₂, co można obserwować w postaci spienienia roztworu w trakcie rozpuszczania preparatu.

2.9. Trwałość ceftazydymu w roztworach wodnych

2.9.1. Mechanizm rozkładu ceftazydymu

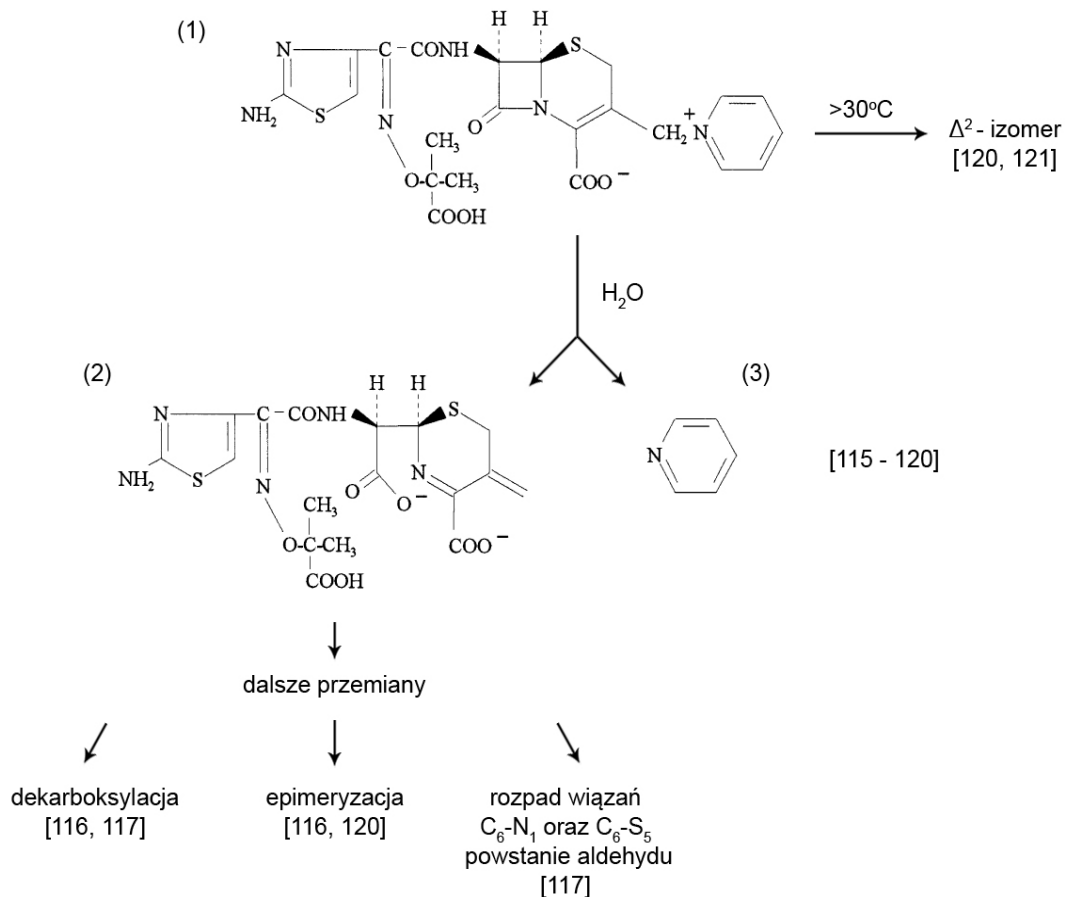
Handlowe preparaty ceftazydymu w postaci jałowego proszku do sporządzania roztworów do wstrzykiwań lub infuzji wykazują znaczną trwałość. Producent zastosowanego w niniejszych badaniach preparatu Biotum deklaruje okres trwałości preparatu: 2 lata [111-112]. Rozkład ceftazydymu w preparacie Biotum w postaci suchej przebiega zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu i jego szybkość jest większa przy ekspozycji na wysoką temperaturę i wyższą wilgotność powietrza oraz na światło [113-114].

Ceftazydym posiada ugrupowanie iminoalkoksyłowe w pozycji *syn*, dzięki czemu zwiększona jest jego oporność na β -laktamazy. Pomimo tego faktu, jak każdy antybiotyk należący do grupy cefalosporyn, ceftazydym zawiera wrażliwy na rozkład pierścień β -laktamowy i charakteryzuje się bardzo niską trwałością w roztworach wodnych. Jako pochodna Δ^2 -cefemu łatwo ulega reakcji hydrolizy, aminolizy i alkoholizy. Głównymi czynnikami, mającymi wpływ na trwałość wodnych roztworów ceftazydymu są: temperatura, stężenie antybiotyku, światło oraz obecność innych substancji w roztworze [115-118].

Mechanizm rozkładu ceftazydymu w roztworach wodnych jest wielokierunkowy (Ryc. 5.), przy czym zawsze skutkuje otwarciem pierścienia β -laktamowego z jednoczesnym odszczepieniem cząsteczki pirydyny [115-120]. Odłączenie bocznego ugrupowania - pirydyny oraz rozpad pierścienia β -laktamowego powoduje powstanie nieaktywnego przeciwdrobnoustrojowo związku, zawierającego w położeniu C-3 grupę metylenową. Sugerowane dalsze drogi rozkładu pochodnej metylenowej polegają na dekarboksylacji przy węglu C-8 oraz na hydrolitycznym rozpadzie wiązań C₆-N₁ oraz C₆-S₅ i ostatecznie na powstaniu ugrupowania aldehydowego [117-118]. Ceftazydym ulega także izomeryzacji, zależnej od pH i temperatury. Odnotowano odwracalną epimeryzację przy węglu C-7 w środowisku zasadowym [116], natomiast w temperaturze powyżej 30°C powstawanie Δ^2 -izomeru [121]. Przeprowadzone badania potwierdziły ponadto, że szybkość rozkładu ceftazydymu w roztworach wodnych jest większa

w wyższej temperaturze, w roztworach o wyższym stężeniu ceftazydymu oraz w roztworach o wyższym pH, przy czym za krytyczne uznano $\text{pH}=10$ [121], powyżej którego rozkład ceftazydymu przebiega bardzo gwałtownie, nawet w niskiej temperaturze. Największą trwałość ceftazydym wykazuje w roztworach o $\text{pH} 4,5 - 6,5$ [115].

W roztworach ceftazydymu z dodatkiem węglowodanów (np. glukozy), lub zawierających alkohole cukrowe (np. mannitol) może zajść reakcja alkoholizy [118]. Jest ona spowodowana atakiem jonów alkoksylowych związków polihydroksylowych na wiązanie β -laktamowe antybiotyku. Szybkość rozkładu ceftazydymu jest proporcjonalna do zawartości związków polihydroksylowych w roztworze.



Ryc. 5. Sugerowane mechanizmy rozkładu ceftazydymu w roztworach wodnych (1) ceftazydym, (2) metylenowa pochodna, (3) pirydyna

2.9.2. Trwałość ceftazydymu w roztworach wodnych do podawania parenteralnego

Ceftazydym należy do grupy antybiotyków cefalosporynowych podawanych wyłącznie pozajelitowo. Ze względu na bardzo niską trwałość ceftazydymu w roztworach wodnych, preparaty do wstrzyknięć czy wlewów sporządzane są bezpośrednio przed podaniem pacjentowi. W ostatnich latach prowadzone były intensywne badania dotyczące trwałości ceftazydymu w roztworach wodnych pod kątem możliwości podawania antybiotyku w powolnym wlewie ciągłym. Wynika to z faktu, że podanie w powolnym wlewie wiąże się z dłuższym czasem ekspozycji roztworu ceftazydymu na temperaturę, światło oraz substancje współobecne w roztworze. Wiadomo natomiast, że powyższe czynniki mają znaczący wpływ na trwałość wodnych roztworów ceftazydymu [114-117, 122].

Decydujący wpływ na szybkość rozkładu ceftazydymu w roztworach wodnych ma temperatura przechowywania. Wodne roztwory ceftazydymu w stężeniach 4-12% pozostały trwałe (rozkład antybiotyku poniżej 10%) przez okres 24 godzin, jeżeli były przechowywane w temperaturze do 25°C [121]. Wyższa temperatura powodowała przyspieszenie rozkładu. Wykazano, że roztwory wodne ceftazydymu (270 mg/ml) przechowywane w temperaturze 4°C są stabilne przez tydzień, natomiast w temperaturze 20°C – jedynie przez 18 godzin. Nawet niewielkie podwyższenie temperatury znacznie przyspieszało rozkład ceftazydymu [120].

Stewart i wsp. [123] badali wpływ różnych warunków temperaturowych, także zamrażania, na trwałość roztworów ceftazydymu (100 i 200 mg/ml), przechowywanych w szklanych fiolkach lub strzykawkach z polipropylenu. Trwałość roztworów, limitowana nie większym niż 10% obniżeniem stężenia ceftazydymu, wyniosła 8 godzin dla temperatury przechowywania 21-23°C oraz 96 godzin dla temperatury 4°C. Taką samą trwałość uzyskano dla roztworów poddanych uprzednio zamrożeniu (-20°C) na okres 28 lub 91 dni.

W badaniu przeprowadzonym przez Nahata i wsp. [124] oznaczono trwałość wodnych roztworów ceftazydymu o stężeniu 100 mg/ml, przechowywanych w plastikowych strzykawkach, w zależności od temperatury przechowywania. Antybiotyk zachował 90% początkowego stężenia w temperaturze 22°C przez 24 godziny, natomiast w temperaturze 4°C przez 10 dni. Roztwory, zamrożone uprzednio do temperatury -20°C

na okres 91 dni, po rozmrożeniu były stabilne przez 7 dni w temperaturze 4°C i przez dobę w temperaturze 22°C. W trakcie przechowywania zaobserwowano obniżenie pH roztworów oraz zmianę koloru na słomkowy do żółtego. W żadnym roztworze nie wytrącił się osad.

Stabilnością cefalosporyn, w tym ceftazydymu, w aspekcie możliwości zastosowania ich roztworów wodnych we wlewie ciągłym zajmował się również zespół Stiles i wsp. [125-126]. Zbadano trwałość roztworów ceftazydymu, poddanych uprzednio zamrożeniu (-20°C) na okres 30 dni, a następnie przechowywanych przez 4 dni w temperaturze 5°C i jeden dzień w temperaturze w 37°C (symulacja 24-godzinne go wlewu w urządzeniu przenośnym). Przez cały cykl badań stężenie ceftazydymu utrzymywało się na poziomie wyższym niż 90% stężenia wyjściowego [125]. Wyniki badań tej samej grupy naukowców [126] udowodniły trwałość ceftazydymu również w następujących warunkach badań, opartych na podobnym schemacie: zamrożenie roztworów ceftazydymu (30 i 60 mg/ml) do temperatury -20°C na okres 30 dni, następnie przechowywanie przez 4 dni w temperaturze 3°C lub 24 godziny w temperaturze 30°C. Wykazano ponadto, że roztwory ceftazydymu (30 i 60 mg/ml) mogą być przechowywane w temperaturze 3°C przez okres 10 dni.

Badania nad możliwością podania ceftazydymu we wlewie ciągłym za pomocą pomp przeznaczonych do noszenia pod ubraniem lub pomp zewnętrznych prowadził zespół Viaene i wsp. [127]. Antybiotyki, w tym ceftazydym, po rozpuszczeniu w wodzie jałowej przechowywano w temperaturach 4°C, 25°C i 37°C przez 24 godziny. Podczas badania roztwory nie były chronione przed światłem. Ceftazydym w stężeniu 120 g/l (roztwór w wodzie jałowej) wykazywał ponad 90% początkowej zawartości przez ponad 24 godziny w temperaturze 25°C i tylko przez 8 godzin w temperaturze 37°C. Ponadto po ośmiu godzinach przechowywania w temperaturze 37°C stężenie powstałego produktu rozkładu ceftazydymu, pirydyny, przekroczyło dopuszczalną przez USP normę (1,1 mg/l dla preparatów parenteralnych). Według autorów [127], ze względu na ograniczoną trwałość, roztwory ceftazydymu nie powinny być podawane za pomocą pomp noszonych pod ubraniem w dłuższych okresach czasu.

Przeprowadzono szereg badań dotyczących wpływu zastosowanego rozpuszczalnika, urządzenia do wlewu czy materiału opakowania (szkło, polipropylen, polietylen, PVC) na stabilność roztworów ceftazydymu przeznaczonych do podania

we wlewie. Wyniki badań prowadzonych przez Gupta i wsp. [128] wyznaczyły trwałość roztworów ceftazydymu (40 mg/ml) w 0,9% NaCl i w 5% glukozie, w zależności od temperatury przechowywania: 2 dni w temperaturze 25°C, 21 dni w temperaturze 5°C i 90 dni w temperaturze -10°C.

Favetta i wsp. [129] określili trwałość ceftazydymu w stężeniu 40 mg/ml w 5% roztworze glukozy oraz w 0,9% roztworze chlorku sodu w czterech różnych urządzeniach do wlewów. Badania wykazały, że trwałość roztworów przechowywanych w temperaturze 37°C różniła się w zależności od zastosowanego urządzenia, ponadto ceftazydym rozkładał się wolniej w roztworze soli fizjologicznej niż w 5% glukozie, jednakże w żadnym przypadku trwałość analizowanych roztworów nie przekroczyła 19 godzin.

Roztwory ceftazydymu o analogicznym składzie: ceftazydym w stężeniu 40 mg/ml w 5% roztworze glukozy oraz w 0,9% roztworze chlorku sodu poddano analizie stabilności w zależności od materiału zastosowanego pojemnika [130]. Oznaczono ilościowo także pirydynę - produkt rozkładu ceftazydymu. Pojemniki wykonane z polipropylenu, polichlorku winylu i szklane butelki napełniono roztworami i przechowywano w temperaturze 20°C i 35°C. Bez względu na użyty rozpuszczalnik i temperaturę przechowywania ceftazydym wykazywał największą trwałość w opakowaniach szklanych. Opakowania z polipropylenu zapewniały minimalnie wyższą trwałość antybiotyku niż opakowania z polichlorku winylu.

Badania nad zastosowaniem opakowań z materiału Biofine (nie zawierającego PVC) do prowadzenia wlewu ciągłego roztworów antybiotyków cefalosporynowych prowadzili Müller i wsp. [131]. Analizowano między innymi trwałość roztworów ceftazydymu (20 mg/ml) w 0,9% NaCl, przechowywanych w opakowaniach z Biofine oraz ze szkła w temperaturze 2-8°C (lodówka) i 25°C. Wyznaczono trwałość, niezależną od zastosowanego materiału: 10 dni w temperaturze 2-8°C oraz 2 dni w temperaturze 25°C.

Określono trwałość roztworów ceftazydymu, sporządzonych na bazie 0,9% NaCl oraz 5% glukozy, przechowywanych w workach infuzyjnych wykonanych z PVC [132]. Stężenie ceftazydymu utrzymywało się na poziomie powyżej 90% wartości początkowej w przypadku przechowywania roztworów przez 24 godziny w temperaturze pokojowej i przez okres 7 dni w temperaturze 4°C, niezależnie od zastosowanego rozpuszczalnika. Zbliżone wyniki uzyskała grupa Xu i wsp. [133], której przedmiotem badań było

określenie stabilności roztworów ceftazydymu, sporządzonych w 0,9% NaCl, przechowywanych w samodozującym systemie infuzyjnym (AutoDose Infusion System). Wyznaczono trwałość roztworów: 7 dni w temperaturze 4°C i 24 godziny w temperaturze 23°C.

Jednym z czynników, powodujących przyspieszenie degradacji ceftazydymu jest światło [114]. Przeprowadzono badanie, mające na celu wykazanie, czy roztwory wodne ceftazydymu mogą być podawane w powolnym wlewie ciągłym (do 24 godzin), bez konieczności zabezpieczania ich przed światłem [134]. Spadek zawartości antybiotyku po 24 godzinach ekspozycji na światło fluorescencyjne o mocy 36 W wyniósł 7,19%. Sugeruje to, pomimo fotolabilności roztworów wodnych ceftazydymu, możliwość prowadzenia ciągłych wlewów bez konieczności zabezpieczania opakowań przed światłem.

2.9.3. Trwałość ceftazydymu w kroplach do oczu, wpływ czynników fizykochemicznych oraz substancji pomocniczych

Ze względu na szerokie spektrum przeciwdrobnoustrojowe, szczególną aktywność wobec niebezpiecznej dla narządu wzroku pałeczki *Pseudomonas aeruginosa* oraz braku toksyczności w stosunku do tkanek oka - ceftazydym w szczególnych przypadkach ostrej infekcji okulistycznych może być stosowany w zastępstwie toksycznych aminoglikozydów, będących obecnie lekami pierwszego rzutu w bakteryjnych zakażeniach oczu. Miejscowo ceftazydym stosowany jest głównie w postaci 5% kropli do oczu jako terapia wspomagająca leczenie ogólne oraz jako kontynuacja intensywnego leczenia szpitalnego w przypadku ciężkich infekcji bakteryjnych przednich struktur oka. Krople z ceftazydymem sporządzane są *ex tempore* przez apteki szpitalne poprzez rozpuszczenie handlowego preparatu ceftazydymu (jałowy proszek do sporządzania roztworów do iniekcji) w różnych rozpuszczalnikach. Stosuje się w tym celu wodę, 0,9% NaCl lub gotowy preparat sztucznych łez [107-109]. Trwałość kropli z ceftazydymem, w zależności od temperatury przechowywania, stężenia antybiotyku czy zastosowanego rozpuszczalnika stała się przedmiotem wielu badań i szeregu publikacji.

Achach i Peroux [107] określili stabilność kropli do oczu z ceftazydymem (50 mg/ml), sporządzonych na bazie 0,9% roztworu NaCl. Krople, przechowywane w temperaturze 4°C, zachowały nie mniej niż 90% początkowej zawartości przez okres 4 dni. Bezpośrednio po sporządzeniu pH kropli wynosiło 6,2, czyli mieściło się w zakresie najwyższej stabilności ceftazydymu (pH 4,5 - 6,4 [115]). Ciśnienie osmotyczne preparatu wynosiło 451 mOsm/l. Podczas przechowywania zaobserwowano towarzyszące rozkładowi antybiotyku zmiany fizyczne kropli: wzrost ciśnienia osmotycznego oraz nieznaczny wzrost pH.

Trwałość ceftazydymu w kroplach do oczu sporządzonych na bazie 0,9% roztworu NaCl stała się również przedmiotem badań Peyron i wsp. [108]. Krople z ceftazydymem (20 mg/ml) przechowywane były w temperaturze 4°C (lodówka) oraz w temperaturze 20°C, chronione lub nie chronione przed światłem. Wyniki badań potwierdziły dominujący wpływ temperatury przechowywania na stabilność roztworów ceftazydymu: krople zachowały nie mniejszą niż 90% zawartość początkową antybiotyku przez 21 dni w temperaturze 4°C i tylko przez 4 dni w temperaturze 20°C. Zaobserwowano również niekorzystny wpływ światła na trwałość preparatu. Porównując wyniki badań obu zespołów [107 i 108], można dodatkowo zaobserwować znaczący wpływ stężenia antybiotyku na trwałość kropli.

Wpływ temperatury przechowywania na trwałość ceftazydymu badano w kroplach do oczu o stężeniu 50 mg/ml, przygotowanych na bazie sztucznych łez (*Sno Tears*), zawierających alkohol poliwinylowy jako substancję zwiększającą lepkość [109]. Krople przechowywano w temperaturach 7°C i 25°C. Po 7 dniach przechowywania w temperaturze 7°C zawartość ceftazydymu była wyższa niż 90% zawartości początkowej. Temperatura 25°C przyspieszyła degradację antybiotyku i po 7 dniach odnotowano tylko 65% jego zawartości początkowej. pH kropli przez cały okres badań mieściło się w zakresie od 6,0 do 7,0. Zaobserwowano również stopniowe żółknięcie preparatu. Ustalono, że 5% krople z ceftazydymem sporządzone na bazie sztucznych łez mogą być przechowywane przez 5 dni w lodówce. Przechowywanie w temperaturze pokojowej nie jest możliwe z powodu nietrwałości antybiotyku. W powyższych badaniach przeprowadzono dodatkowo analizę ilościową pirydyny, produktu rozkładu ceftazydymu. Odnotowano niemal 100% bilans masy pomiędzy rozłożonym ceftazydymem a powstałą pirydyną. Potwierdza to mechanizm rozkładu antybiotyku, polegający na odłączeniu pirydyny przy węglu C-3 ceftazydymu. Oznaczone stężenia pirydyny były znacznie niższe

od stężeń, dla których nie obserwowano jeszcze toksycznych objawów po podaniu do oka (63 mg/ml, badania na królikach [135]). Ponadto zaobserwowano również sorpcję pirydyny do korków gumowych zastosowanych opakowań.

Zespół Chédru-Legros i wsp. [136-137] zaproponował możliwość sporządzania kropli do oczu z nietrwałymi w roztworach wodnych antybiotykami, a następnie ich mrożenie do temperatury -20°C w celu późniejszego użycia. Analizowane 5% krople z ceftazydymem sporządzone zostały na bazie 0,9% NaCl. Po 75 dniach [136] lub po 6 miesiącach [137] przechowywania w temperaturze -20°C nie zaobserwowano istotnych zmian właściwości fizycznych i chemicznych kropli. pH kropli wynosiło 6,47, ciśnienie osmotyczne 488 mOsm/l. Krople pozostały jałowe przez okres mrożenia. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań stabilności kropli po rozmrożeniu [136] zaproponowano okres trwałości kropli: 3 dni w temperaturze 4°C .

Zbadano wpływ warunków przechowywania na aktywność przeciwdrobnoustrojową kropli z ceftazydymem (50 mg/ml), sporządzonych z użyciem BSS¹ (*balanced salt solution*) jako rozpuszczalnika [138]. Krople, przechowywane w temperaturze 4°C zachowały aktywność wobec *Pseudomonas aeruginosa* przez okres 14 dni, natomiast tylko przez 7 dni w przypadku przechowywania w temperaturze 24°C . Nie zaobserwowano negatywnego wpływu światła na aktywność przeciwdrobnoustrojową kropli.

Kodym i wsp. [139] zaproponowali składy recepturowe 1% kropli do oczu z ceftazydymem, wykonanych na bazie buforu cytrynianowego, także w wersjach o zwiększonej lepkości (alkohol poliwinylowy) i konserwowanych. Krople, chronione przed światłem, przechowywane były w temperaturach 4°C i 20°C . Zbadano trwałość fizyczną a także trwałość w aspekcie aktywności przeciwdrobnoustrojowej (metoda cylinderkowo-płytkowa) tak sporządzonych kropli. Wykazano, że krople przechowywane w temperaturze 4°C są trwałe powyżej 30 dni, natomiast przechowywane w temperaturze 20°C tylko przez okres 14 dni. Równocześnie obserwowano zmiany pH, ciśnienia osmotycznego, barwy i zapachu, świadczące o postępującym rozkładzie antybiotyku. Technologia zaproponowana przez Kodym i wsp. [139] stała się inspiracją do dalszych badań, będących tematem niniejszej pracy.

¹ BSS - balanced salt solution, Alcon Laboratories, Inc., izotoniczny roztwór do irygacji, pH = 7,5

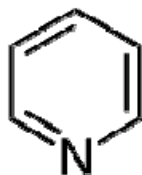
Głównym produktem rozkładu ceftazydymu jest pirydyna [115-117, 119-121, 129, 140], która należy do wykazu substancji szkodliwych i może powodować uszkodzenia rogówki i siatkówki w kontakcie z okiem. Z tego względu trwałość kropli do oczu z ceftazydymem powinna być limitowana nie tylko trwałością ceftazydymu, ale także stężeniem powstającej w wyniku rozkładu antybiotyku pirydyny.

3. Pirydyna – toksyczny produkt rozkładu ceftazydymu

3.1. Struktura i właściwości chemiczne

Pirydyna to sześciocłonowy związek heterocykliczny z grupy azyn (Ryc. 6). Jest to bezbarwna ciecz o charakterystycznym zapachu, silnie higroskopijna. Z wodą miesza się w każdym stosunku. Ma właściwości słabo zasadowe, z mocnymi kwasami tworzy krystaliczne sole pirydyniowe.

Pirydyna otrzymywana jest na drodze destylacji ze smoły węglowej lub syntetycznie z amoniaku i aldehydu octowego. Jest szeroko stosowanym rozpuszczalnikiem w syntezie organicznej. Zaletą pirydyny jest mieszalność z innymi rozpuszczalnikami, takimi jak heksan, DMF czy woda. Deuterowana pirydyna jest stosowana jako rozpuszczalnik do próbek w spektroskopii NMR. Jej pochodne stosowane są również do skażania alkoholu etylowego przeznaczonego do celów przemysłowych (denaturat). Sama pirydyna jest związkiem wyjściowym do syntezy wielu insektycydów, herbicydów, leków, barwników oraz materiałów wybuchowych [141-143].



Ryc. 6. Pirydyna

3.2. Metabolizm pirydyny

Pirydyna jest metabolizowana głównie do N-metylopirydyny. Metabolit ten zidentyfikowano między innymi w ludzkim moczu po doustnym podaniu pirydyny. W dobowej zbiorce moczu N-metylopirydyna była obecna w ilości odpowiadającej 9% dawki wyjściowej pirydyny [144]. W moczu zidentyfikowano także N-tlenek pirydyny [145]. Inne metabolity pirydyny to 2-pirydon, 4-pirydon i 3-hydroksypirydyna [146].

3.3. Toksyczność pirydyny [141, 147-150]

Pirydyna jest szkodliwa w przypadku połknięcia, inhalacji lub kontaktu ze skórą. W przypadku ostrego zatrucia objawami są oszołomienie, ból i zawroty głowy, mdłości, ślinienie, spadek łaknienia. Może dojść do ostrych bólów brzucha, zatoru płucnego i utraty przytomności. Pirydyna działa hepatotoksycznie, neurotoksycznie, uczulająco, uszkadza układ pokarmowy, drażni skórę i błony śluzowe. Nie ma wystarczających danych, aby stwierdzić, czy pirydyna upośledza funkcje rozrodcze i działa rakotwórczo i genotoksycznie u ludzi, choć istnieją ograniczone dowody na działanie rakotwórcze u zwierząt.

Pirydyna może wywoływać szereg toksycznych objawów, w zależności od rodzaju ekspozycji i drogi wchłaniania. Po doustnym spożyciu może powodować podrażnienie żołądkowo-jelitowe z nudnościami, wymiotami i biegunką. Może dojść do uszkodzenia wątroby, nerek i ośrodkowego układu nerwowego. Śmierć po zatruciu pirydyną następuje na skutek niewydolności oddechowej. Wdychanie wysokich dawek prowadzi do podrażnienia układu oddechowego oraz do zaburzeń centralnego systemu nerwowego. W kontakcie ze skórą pirydyna powoduje ból i zaczerwienienie, a przewlekłe narażenie na pirydynę może powodować wysypkę i uczulenie na światło. Może dojść również do absorpcji pirydyny przez skórę. Dostanie się do oka może powodować poważne podrażnienia i poparzenia. Pierwsza pomoc w przypadku kontaktu oczu z czystą pirydyną polega na obfitym przemywaniu oczu chłodną wodą co najmniej przez 15 minut, w przypadku znacznej ekspozycji wskazana jest kontrola okulistyczna ze względu na możliwość uszkodzenia tęczówki lub rogówki.

Wyniki przeprowadzonych na królikach badań [135] wykazały brak toksyczności w stosunku do tkanek oka pirydyny zastosowanej miejscowo w stężeniu 63 mg/ml. W 5% kroplach do oczu, w których ubytek ceftazydymu nie przekroczył 10% jego pierwotnej zawartości, stężenie pirydyny wynosiło poniżej 63 mg/ml [109]. Wykazano także, że 10% degradacja ceftazydymu w 5,8% roztworze powoduje powstanie około 0,5 mg/ml pirydyny [140].

Ponieważ na rynku farmaceutycznym nie jest zarejestrowany żaden preparat z ceftazydymem do stosowania miejscowego w okulistyce – nie ma również określonych limitów stężeń produktu rozkładu ceftazydymu – pirydyny w preparatach podawanych do oka. Zgodnie z Dyrektywą 67/548/EWG [151] w sprawie klasyfikacji niebezpiecznych substancji chemicznych, pirydyna należy do grupy substancji szkodliwych – grupa Xn, R20/21/22, w związku z tym określając trwałość kropli do oczu z ceftazydymem należało również uwzględnić wpływ pirydyny, co zostało szerzej omówione i przedyskutowane w *Omówieniu Wyników* w niniejszej pracy.

4. Charakterystyka substancji pomocniczych użytych w technologii kropli do oczu z ceftazydymem

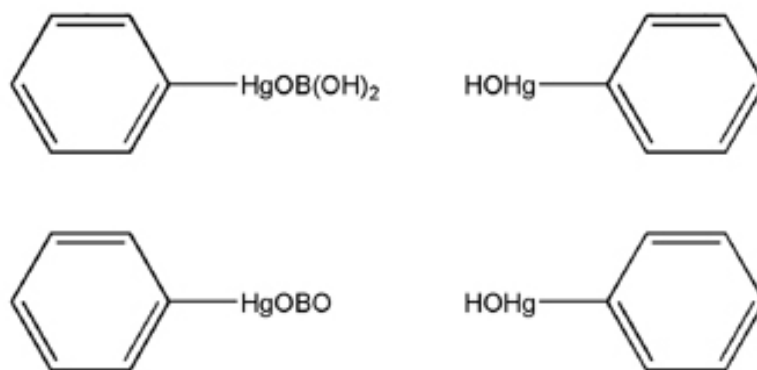
Niniejsza praca jest kontynuacją i rozwinięciem badań, zapoczątkowanych przez Kodym i wsp. [139], dotyczących technologii kropli do oczu z antybiotykami cefalosporynowymi, w tym z ceftazydymem. W oparciu o pozytywne wyniki badań, uzyskane przez zespół Kodym i wsp. - do składu kropli, których recepturę zastosowano w niniejszej pracy, włączono te same substancje pomocnicze, których użyto przy opracowaniu technologii 1% kropli recepturowych [139].

4.1. Bufor cytrynianowy

pH płynu łzowego mieści się w granicach 7,0 - 7,4. Za odczyn ten odpowiada bufor płynu łzowego, w skład którego wchodzi wodorowęglan sodu, dwutlenek węgla i białka. Pojemność buforowa płynu łzowego umożliwia bezpieczne wprowadzenie do oka kropli o pH 3,5 - 8,0. Cefazydym, podobnie jak pozostałe antybiotyki posiadające ugrupowanie β -laktamowe, nie jest trwały w roztworach wodnych. pH wodnych roztworów ceftazydymu, otrzymanych przez rozpuszczenie w wodzie gotowych, handlowych preparatów ceftazydymu z dodatkiem węglanu sodu wynosi, w zależności od stężenia antybiotyku: 7,0 - 7,5 i nie ulega istotnym zmianom w trakcie przechowywania [122, 152]. Badania Zhou i wsp. [115] wykazały, że ceftazydym charakteryzuje się największą trwałością w roztworach o pH zawartym w granicach 4,5 - 6,5. Z tego powodu w niniejszej pracy zastosowano bufor cytrynianowy, zaproponowany przez Kodym i wsp. [139], o składzie gwarantującym kroplom z ceftazydymem pH euhydryczne - korzystne dla trwałości antybiotyku i mieszczące się w granicach tolerancji oka. Skład buforu oraz jego właściwości fizyczne przedstawiono w punkcie 4.1. *Części Doświadczalnej* pracy.

4.2. Boran fenylortęciowy [18, 153, 154]

Syn. Merfen, Phenylhydrargyri boras



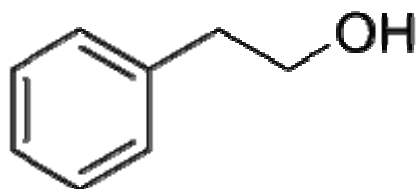
Ryc. 7. Boran fenylortęciowy

Boran fenylortęciowy stanowi mieszaninę wodorotlenku fenylortęciowego i ortoboranu fenylortęciowego lub metaboranu fenylortęciowego (Ryc. 7.). Ma postać bezbarwnych, błyszczących kryształów lub białego, krystalicznego proszku. Substancja ta jest rozpuszczalna w wodzie (we wrzącej wodzie 1:100, w zimnej wodzie 1:500), rozpuszcza się w etanolu 760 g/l (1:150). Praktycznie nie rozpuszcza się w eterze etylowym. Roztwór o stężeniu 10 mg/ml wykazuje pH od 6,4 do 7,2.

Boran fenylortęciowy należy do grupy związków o charakterze kationowo-czynnym, maksimum działania wykazuje przy pH 6,0 - 10,0. Mechanizm działania przeciwbakteryjnego polega na łączeniu się dwuwartościowych jonów rtęci z grupami tiolowymi enzymów bakteryjnych, co prowadzi do zaburzeń metabolizmu komórki bakteryjnej. Boran fenylortęciowy znalazł zastosowanie głównie jako środek konserwujący w kroplach do oczu (w stężeniu 0,001% - wg FPV [154]). Powoduje on niestety wiele interakcji a ponadto przy dłuższym stosowaniu preparatów do oka zawierających w składzie boran fenylortęciowy – może dochodzić do odkładania się rtęci w rogówce.

4.3. Alkohol β -fenyloetylowy [18, 153, 154]

Syn. 2-Fenyloetanol, Alcohol phenylethylis



Ryc. 8. Alkohol β -fenyloetylowy

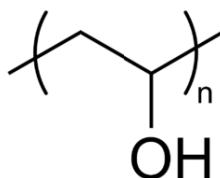
Alkohol β -fenyloetylowy jest bezbarwną, przezroczystą cieczą o charakterystycznym, różanym zapachu. Substancja łatwo miesza się z etanolem (760 g/l), eterem etylowym, glicerolem, glikolem propylenowym i olejami, dość trudno miesza się z wodą (1:50). Jest wrażliwa na światło i substancje utleniające, dlatego powinna być przechowywana w temperaturze nie wyższej niż 15°C, w szczelnie zamkniętych opakowaniach, w suchym i ciemnym miejscu.

Alkohol β -fenyloetylowy znalazł zastosowanie jako składnik mieszanin konserwujących. Jego działanie polega głównie na zwiększaniu przepuszczalności błon komórkowych bakterii, przez co ułatwione jest przenikanie do wnętrza komórki właściwego środka konserwującego. Szczególnie korzystne jest połączenie alkoholu β -fenyloetylowego z czwartorzędowymi zasadami amoniowymi. To skojarzenie pozwala na zastosowanie mniejszych stężeń obu związków i utrudnia powstawanie oporności.

Alkohol β -fenyloetylowy jest stosowany w stężeniach od 0,3% do 0,5% przede wszystkim jako konserwant kropli do oczu (wg FPV [154] – stężenie 0,4%) oraz preparatów dermatologicznych i doustnych.

4.4. Alkohol poliwinylowy [18, 155, 156]

Syn. Poli(alkohol winylowy), PVA, Alcohol polyvinilicus



Ryc. 9. Alkohol poliwinylowy

Zwiększenie lepkości kropli do oczu pozwala na wydłużenie czasu kontaktu substancji leczniczej z gałką oczną nawet do 1 godziny. Dzięki zawartości substancji białkowych i lipidowych lepkość płynu łzowego, zależnie od wieku i stanu zdrowia pacjenta, wynosi około 1-3 mPa·s. Krople do oczu o zwiększonej lepkości powinny charakteryzować się lepkością 12-15 mPa·s. Przekroczenie wartości 20 mPa·s może spowodować zacopowanie kanalików łzowych. W niniejszej pracy, ze względu na brak interakcji z ceftazydymem oraz z pozostałymi składnikami kropli a także ze względu na znaczną trwałość jego roztworów wodnych [139], jako substancję zwiększającą lepkość kropli zastosowano alkohol poliwinylowy.

Alkohol poliwinylowy ma postać białego lub jasnożółtego krystalicznego proszku lub półprzezroczystych granulek. Do celów farmaceutycznych stosuje się odmianę, która po całkowitej hydrolizie pozbawiona jest toksycznego monomeru – octanu winylu. Alkohol poliwinylowy rozpuszcza się w wodzie i w wodorotlenkach metali alkalicznych, jest trudno rozpuszczalny w etanolu 760 g/l oraz nierozpuszczalny w większości rozpuszczalników organicznych. Stosowany jest jako składnik klejów, lakierów, stabilizator farb emulsyjnych, do produkcji rękawic ochronnych, nici chirurgicznych. W technologii postaci leku alkohol poliwinylowy ma zastosowanie w produkcji granulatów, tabletek, jako substancja powlekająca oraz jako środek zwiększający lepkość w technologii kropli do oczu.

III CEL PRACY

Cel pracy

1. Opracowanie technologii 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w czterech wersjach recepturowych dla każdego stężenia, o trwałości wystarczającej na przeprowadzenie kilkunastodniowego leczenia, określonej czasem, w którym stężenie ceftazydymu w kroplach przechowywanych w temperaturze 4°C i chronionych przed światłem będzie utrzymywało się na poziomie nie niższym niż 90% początkowego stężenia antybiotyku.
2. Opracowanie i zwalidowanie metody ilościowego oznaczania ceftazydymu w zaprojektowanych wersjach kropli metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC).
3. Zbadanie wpływu niezbędnych w składzie kropli, wybranych substancji pomocniczych (rozpuszczalników, substancji buforujących, substancji zwiększającej lepkość oraz substancji konserwujących), temperatury przechowywania oraz stężenia ceftazydymu na właściwości fizyczne oraz trwałość 1% i 5% kropli recepturowych z ceftazydymem.
4. Opracowanie składu i sposobu wykonania rozpuszczalników, przeznaczonych do sporządzania 1% i 5% „przemysłowych” kropli z ceftazydymem, z określeniem ich trwałości testem przyspieszonym i testem długoterminowym (zgodnie z wytycznymi ICH) oraz analizą skuteczności przeciwdrobnoustrojowej w przypadku wersji konserwowanych.
5. Określenie trwałości ceftazydymu w 1% i 5% „przemysłowych” kroplach do oczu z ceftazydymem, wykonanych z użyciem rozpuszczalników świeżo sporządzonych oraz poddanych badaniom trwałości testem przyspieszonego starzenia zgodnie z wytycznymi ICH (6 miesięcy w temperaturze 40°C ± 2°C / 75 RH ± 5 RH).
6. Określenie, czy produkt rozkładu ceftazydymu - pirydyna, nie przekracza dopuszczalnych stężeń w limitowanym zawartością ceftazydymu, wyznaczonym okresie trwałości kropli.

IV CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Materiał do badań

- ❖ 1% i 5% (m/m) roztwory wodne ceftazydymu
- ❖ Roztwory substancji pomocniczych, zastosowane do sporządzenia 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych i „przemysłowych”:
 - ✓ bufony cytrynianowe pH 6,10 - 6,24
 - ✓ roztwór alkoholu poliwinylowego (PVA) o lepkości 42,11 mPa·s
 - ✓ 0,04% roztwór boranu fenylortęciowego
- ❖ Rozpuszczalniki przeznaczone do produkcji 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”:
 - ✓ bezpośrednio po sporządzeniu
 - ✓ poddane procesowi przyspieszonego starzenia przez okres 6 miesięcy (40°C/75 RH ± 5 RH)
 - ✓ poddane długoterminowemu badaniu stabilności przez okres 12 miesięcy (25°C/60 RH ± 5 RH)
- ❖ 1% i 5% (m/m) krople do oczu z ceftazydymem:
 - ✓ wersje recepturowe
 - ✓ wersje „przemysłowe”, wykonane z wykorzystaniem świeżo sporządzonych rozpuszczalników
 - ✓ wersje „przemysłowe”, sporządzone z wykorzystaniem rozpuszczalników poddanych uprzednio procesowi przyspieszonego starzenia przez okres 6 miesięcy (40°C/75 RH ± 5 RH)

Skład recepturowy roztworów wodnych oraz kropli do oczu z ceftazydymem przedstawiono w tabeli 14.

2. Odczynniki do badań

- Biotum[®] (Ceftazidimum), fiolki 1,0 g – w przeliczeniu na ceftazydym
substancja sucha do sporządzania roztworów do wstrzykiwań domięśniowych i dożylnych
seria: 5010607 A
seria: 5020708 A
seria: 5050909 A
Bioton S.A.
- Ceftazidime CRS
(wzorzec do HPLC według Ph Eur 6.0)
seria B1
Strasbourg Cedex 1
- Kwas cytrynowy jednowodny cz.d.a.
(Citric acid monohydrate pure p.a.)
seria: 0296/10/05
POCH S.A. Gliwice
- Sodu cytrynian dwuwodny
(tri- Sodium citrate dihydrate pure p.a.)
serie: 0713/07/05, 0709/12/05, 0718/01/06
POCH S.A. Gliwice
- Alkohol poliwinylowy (PVA) m.cz. 72 000
(Polivinył alcohol 72 000)
serie: 0253/06/04, 0339/10/06, 1019/08/07, 1022/05/08
POCH S.A. Gliwice
- Boran fenylortęciowy
(Phenylomeric borate)
The Sigma – Aldrich Library of Rare Chemicals
- Alkohol β-feniloetylowy
(2-Phenylethanol)
serie: 114K0078, 017K0670, 108K0106
Sigma-Aldrich Chemie GmbH

- Acetonitryl (czystość do HPLC), HPLC Gradient Grade
seria: 0728808008
J. T. Baker, Holland
- Alkohol metylowy (czystość do HPLC), HPLC Isocratic Grade
J. T. Baker Holland
seria: 0700515006
- Disodu wodorofosforan bezwodny (czystość do HPLC)
(Sodium phosphate dibasic, anhydrous; Disodium hydrogen phosphate)
seria: B14H25
J. T. Baker, Holland
- Potasu diwodorofosforan (czystość do HPLC)
(Potassium phosphate monobasic)
seria: E18477
J. T. Baker, Holland
- Pirydyna (wzorzec do chromatografii gazowej)
seria: 1/2007
Z. D. Chemipan
- Uracyl HPCE > 99,0%
seria: 2006219
Fluka
- Bufor kalibracyjny Hamilton Duracal 4,01 ± 0,01
seria: 1312829
Hamilton Bonaduz AG
- Bufor kalibracyjny Hamilton Duracal 7,00 ± 0,01
seria: 1314185
Hamilton Bonaduz AG

3. Sprzęt i aparatura

- Zestaw HPLC Shimadzu, Kioto, Japan:
 - Degazer DGU-20A5
 - Pompa LC-20AD
 - Autosampler z chłodzeniem SIL-20AC
 - Piec na kolumnę z chłodzeniem CTO-20AC
 - Detektor SPD-M20A
 - Układ sterowniczy CMB-20A
 - Komputer HP z oprogramowaniem LC Solution

- Kolumna Grace Smart RP-18; 5 μm ; 250 mm x 4,6 mm
SN 0180100117, PN 5138810
Grace, United States

- Prekolumna chromatograficzna:
AlltimaTMHP C-18 (5 μm , 7,5 x 4,6 mm)
Alltech (Belgia)

- Spektrofotometr UV-Vis,
typ Jasco V-530
Jasco Corporation, Japan

- pH-metr, IQ 150
IQ Scientific Instruments

- pH-metr CP-502
Elmator *sp.j.* Zabrze-Grzybowice

- Osmometr-Krioskop 800 cl
Trident Med S.C., Warszawa

- Wiskozymetr Höpplera KF10
RheoTec Meßtechnik GmbH, Niemcy

- Gęstościomierz Densito 30 PX
Mettler Toledo GmbH, Szwajcaria,
- Łoża do pracy aseptycznej, KL-21
POLON, Poznań S.A.
- Sterylizator powietrzny, SP-65 W
Wamed, Warszawa
- Sterylizator parowy, AS 446, wersja WPA
- Suszarka laboratoryjna, SUP-100 M
Wamed, Warszawa
- Aparat destylacyjny DE 8/70
Telmed[®], Warszawa
- Synergy System do otrzymywania wody ultraczystej
Millipore SAS, Francja
- Chłodziarki farmaceutyczne MED-28
Kirsch, Niemcy
- Waga analityczna Sartorius, LE 225 D
(max 220 g, d=0,01 mg)
Sartorius, Niemcy
- Waga elektroniczna, WPS 100/C/2
(max 110 g, min. 20 mg, d=1 mg)
Radwag, Radom
- Waga elektroniczna, WPS 720/C/2
(max 720 g, min. 40 mg, d=2 mg)
Radwag, Radom

- Waga elektroniczna, WPT 3C
(max 3 kg, d=0,1g, e=1g)
Radwag, Radom
- Zestaw do sączenia mikrobiologicznego, typ16692
Sartorius AG, Niemcy
- Mieszadło mechaniczne
Ika – Werke GmbH & Co KG, Niemcy
- Płytką grzejną CIR 120
Falc Instruments S.r.l., Treviglio, Włochy
- Łażnia wodna MLL 147
AJL, Kraków, Polska
- Myjka ultradźwiękowa Sonic-10
POLSONIC Sp. z o.o., Warszawa, Polska
- Pipeta półautomatyczna (Mikropipeta),
LM100 / 10-100 μ l, LabMate (dokładność: \pm 0,8%)
PZ HTL S.A., Warszawa
- Pipeta półautomatyczna (Mikropipeta),
LM1000 / 100-1000 μ l, LabMate (dokładność: \pm 0,6%)
PZ HTL S.A., Warszawa
- Sączki do faz ruchomych Millipore 45 μ m
Millipore Corp., USA
- Sączki membranowe strzykawkowe Chromafil Pet-45/15 MS
Macherey - Nagel
- Laboratoryjny sprzęt szklany

4. Sporządzenie i ocena fizykochemiczna roztworów substancji pomocniczych, zastosowanych w technologii kropli do oczu z ceftazydymem

4.1. Bufory cytrynianowe

W niniejszej pracy zastosowano dwa rodzaje buforów cytrynianowych, przeznaczonych do sporządzania: kropli o niemodyfikowanej lepkości (bufor I) lub kropli o zwiększonej lepkości (bufor II). Stężenia składników w buforze II są dwukrotnie wyższe niż w buforze I, ze względu na metodykę sporządzania wersji kropli o zwiększonej lepkości (punkt 8.3). Skład roztworów buforowych przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Skład buforów cytrynianowych

Składnik	Bufor cytrynianowy	
	I	II
Sodu cytrynian dwuwodny	10,201 mM (3,0 g)	20,4,2 mM (6,0 g)
Kwas cytrynowy jednowodny	0,714 mM (0,15 g)	1,428 mM (0,3 g)
Woda oczyszczona	do 100,0 g	do 100,0 g

Tok postępowania

W połowie przepisanej dla każdego z buforów ilości wody rozpuszczono: sodu cytrynian dwuwodny, w drugiej połowie: kwas cytrynowy jednowodny. Roztwory połączono i dokładnie zmieszano. Każdy z otrzymanych buforów przesączono przez sącdek ze szkła spiekanego typu Schott G3. Po około godzinie zmierzono pH i ciśnienie osmotyczne sporządzonych buforów. Bufory rozlano do butelek infuzyjnych pojemności 250 i 500 ml, zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami i wyjałowiono w autoklawie w temperaturze $120^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ przy nadciśnieniu 101,1 kPa przez 20 minut. Ponownie zmierzono pH i ciśnienie osmotyczne wyjałowionych buforów.

Wyniki oceny jakościowej buforów cytrynianowych przed i po wyjałowieniu przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Wyniki oceny fizycznej buforów cytrynianowych

Bufor	Przed wyjałowieniem			Po wyjałowieniu		
	pH	ciśnienie osmotyczne [mOsm/l]	przezroczystość zabarwienie	pH	ciśnienie osmotyczne [mOsm/l]	przezroczystość zabarwienie
I	6,24 ± 0,01	301 ± 0	przezroczysty bezbarwny	6,24 ± 0,00	297 ± 1	przezroczysty bezbarwny
II	6,10 ± 0,02	588 ± 5	przezroczysty bezbarwny	6,10 ± 0,00	586 ± 4	przezroczysty bezbarwny

4.2. Roztwór alkoholu poliwinylowego

W celu sporządzenia kropli o zwiększonej lepkości przygotowano roztwór alkoholu poliwinylowego z zastosowaniem polimeru o średniej masie cząsteczkowej 72 000.

Tabela 3. Skład roztworu alkoholu poliwinylowego

Składnik	Ilość [g]
Alkohol poliwinylowy (m.cz. 72 000)	6,0
Woda oczyszczona	94,0

Tok postępowania

Na powierzchnię wody o temperaturze pokojowej, podczas ciągłego mieszania (mieszadło mechaniczne, 300 obr./min), powoli wsypano odważony uprzednio alkohol poliwinylowy. Utrzymując ciągle mieszanie roztwór ogrzewano na łaźni wodnej w temperaturze 90°C przez około 90 minut, do rozpuszczenia substancji. Przezroczysty roztwór ochłodzono, uzupełniono wodą destylowaną do wymaganej masy i przesączono przez sącdek klarujący ze szkła spiekanego typu Schott G1. Zmierzono pH, ciśnienie osmotyczne oraz lepkość otrzymanego roztworu, który następnie rozlano do butelek infuzyjnych o pojemności 250 ml, zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami i wyjałowiono w autoklawie w temperaturze 120°C ± 2°C przy nadciśnieniu 101,1 kPa przez 20 minut. Ponownie dokonano oceny fizycznej wyjałowionych roztworów.

Wyniki oceny jakościowej roztworu alkoholu poliwinylowego przed i po wyjałowieniu przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Wyniki oceny fizycznej roztworu alkoholu poliwinylowego

Roztwór alkoholu poliwinylowego							
Przed wyjałowieniem				Po wyjałowieniu			
pH	ciśnienie osmotyczne [mOsm/l]	lepkość [mPa·s]	przezroczystość zabarwienie	pH	ciśnienie osmotyczne [mOsm/l]	lepkość [mPa·s]	przezroczystość zabarwienie
6,02 ± 0,00	29 ± 1	43,20 ± 0,00	przezroczysty bezbarwny	5,51 ± 0,02	27 ± 1	42,11 ± 0,01	przezroczysty bezbarwny

4.3. Środki konserwujące

4.3.1. Roztwór boranu fenylortęciowego

Tabela 5. Skład roztworu boranu fenylortęciowego

Składnik	Ilość [g]
Boran fenylortęciowy	0,04
Woda oczyszczona	99,96

Tok postępowania

Boran fenylortęciowy rozpuszczono w wodzie oczyszczonej, podgrzanej do temperatury około 95°C. Otrzymany 0,04% roztwór przesączono przez sączek Schott G-3, przelano do butelki infuzyjnej o pojemności 100 ml, zamknięto przy pomocy gumowego korka i metalowego kapsla i wyjałowiono w autoklawie w temperaturze 120°C ± 2°C przy nadciśnieniu 101,1 kPa przez 20 minut. W warunkach aseptycznych jałowy roztwór rozlano do jałowych butelek z ciemnego szkła z zakraplaczami.

4.3.2. Alkohol β-fenylloetylowy

Tok postępowania

Alkohol β-fenylloetylowy w warunkach aseptycznych przelano do jałowej butelki z ciemnego szkła, zamknięto zakraplaczem i oznaczono sygnaturą.

5. Badanie zgodności farmaceutycznej 5% roztworów ceftazydymu z substancjami pomocniczymi zastosowanymi w składzie kropli

Analogicznie do wcześniejszych badań, których celem było opracowanie technologii 1% recepturowych kropli do oczu z ceftazydymem, prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Technologii Postaci Leku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu [139], w ramach niniejszej pracy przeprowadzono test zgodności farmaceutycznej 5% wodnego roztworu ceftazydymu z substancjami pomocniczymi, które w założeniu pracy miały być włączone do składu kropli do oczu w wersjach recepturowych oraz w wersjach „przemysłowych”.

5% wodne roztwory ceftazydymu z dodatkiem poszczególnych substancji pomocniczych w założonych stężeniach przechowywane były bez dostępu światła przez okres 14 dni w temperaturach 4°C i 20°C. Jako próbę kontrolną równocześnie przechowywano 5% roztwór ceftazydymu bez substancji pomocniczych. Wyniki oceny roztworów w aspekcie ewentualnych interakcji przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Badanie zgodności farmaceutycznej 5% roztworów ceftazydymu z substancjami pomocniczymi, zastosowanymi w składzie kropli

5% wodny roztwór ceftazydymu		przezroczystość zabarwienie			Interakcja
Substancja pomocnicza	Stężenie [%]	po sporządzeniu	po 14 dniach przechowywania		
			4°C	20°C	
Składniki buforu cytrynianowego I:					
sodu cytrynian dwuwodny kwas cytrynowy jednowodny	3,0 0,15	przezroczysty słomkowy	przezroczysty słomkowy	przezroczysty jasnożółty	brak
Poliwinyloalkohol (PVA)	~ 3,0	przezroczysty słomkowy	przezroczysty słomkowy	przezroczysty jasnożółty	brak
Boran fenylortęciowy	0,001	przezroczysty słomkowy	przezroczysty słomkowy	przezroczysty jasnożółty	brak
Alkohol β-feniloetylowy	0,4	przezroczysty słomkowy	przezroczysty słomkowy	przezroczysty jasnożółty	brak
Bez substancji pomocniczych (roztwór kontrolny)	---	przezroczysty słomkowy	przezroczysty słomkowy	przezroczysty jasnożółty	---

6. Skład, sporządzenie, ocena fizykochemiczna oraz ocena skuteczności przeciwdrobnoustrojowej rozpuszczalników do 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”

Niska trwałość ceftazydymu w roztworach wodnych wyklucza możliwość przemysłowej produkcji kropli do oczu z ceftazydymem w postaci roztworu. Słuszna zatem dla handlowej postaci leku wydaje się być, zastosowana w niniejszej pracy, technologia oparta na opakowaniu dwukomorowym, które umożliwia rozdzielenie antybiotyku od rozpuszczalnika. Połączenie zawartości obu komór: ceftazydymu w postaci liofilizowanego proszku z osobno przechowywanym, jałowym rozpuszczalnikiem umożliwia otrzymanie kropli w postaci jałowego roztworu. Technologia kropli w wersjach „przemysłowych” oraz ich trwałość jest przedmiotem drugiej części niniejszej pracy.

6.1. Skład rozpuszczalników do 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”

Na podstawie wyników badań trwałości chemicznej ceftazydymu w kroplach recepturowych (punkt 11.6.4.), ustalono najbardziej optymalny skład rozpuszczalników dla 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, opartych na technologii dwukomorowej.

Skład rozpuszczalników, przeznaczonych do sporządzania kropli do oczu w wersjach „przemysłowych” przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Skład rozpuszczalników do 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”

Składnik	Składniki rozpuszczalników [g] na 100 g rozpuszczalnika							
	Rozpuszczalniki do 1% kropli				Rozpuszczalniki do 5% kropli			
	1	2	3	4	I	II	III	IV
Sodu cytrynian dwuwodny	3,00	2,912	3,00	2,912	3,00	2,912	3,00	2,912
Kwas cytrynowy jednowodny	0,150	0,146	0,150	0,146	0,150	0,146	0,150	0,146
Roztwór alkoholu poliwinylowego (PVA) $\eta = 44,21 \text{ mPa}\cdot\text{s}$	-	-	50,00	48,535	-	-	50,00	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 100,00	do 100,00	do 100,00	do 100,00	do 100,00	do 100,00	do 100,00	do 100,00

6.2. Metoda sporządzania rozpuszczalników do 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”

Roztwory substancji pomocniczych, które zostały użyte w produkcji rozpuszczalników do kropli w wersjach „przemysłowych”, zostały sporządzone zgodnie z procedurą (z pominięciem procesu sterylizacji), podaną w punktach:

- ❖ bufor cytrynianowy I i II (punkt 4.1.)
- ❖ roztwór alkoholu poliwinylowego (PVA) o $\eta = 44,21 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ (punkt 4.2.)
- ❖ 0,04% roztwór boranu fenylortęciowego (punkt 4.3.1.)
- ❖ alkohol β -fenyloetylowy (punkt 4.3.2.)

W zależności od składu danej wersji kropli, rozpuszczalniki „przemysłowe” sporządzono według poniżej przedstawionych procedur. Wszystkie rozpuszczalniki bezpośrednio po sporządzeniu zostały wyjałowione w autoklawie w temperaturze $120^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ przy nadciśnieniu 101,1 kPa przez 20 minut.

Rozpuszczalnik nr 1 i nr I

Bufor cytrynianowy I przesączono przez sączonek ze szkła spiekanego typu Schott G3, rozlano do butelek infuzyjnych o pojemności 100 ml, które zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami.

Rozpuszczalnik nr 2 i nr II

Bufor cytrynianowy I zakonserwowano przepisaną ilością środków konserwujących, odpowiednią dla wersji 2 i II rozpuszczalnika. Otrzymane roztwory przesączono przez sączoneki ze szkła spiekanego typu Schott G3, rozlano do butelek infuzyjnych o pojemności 100 ml, które zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami.

Rozpuszczalnik nr 3 i nr III

Podczas ciągłego mieszania do roztworu alkoholu poliwinylowego dodawano powoli bufor cytrynianowy II. Tak otrzymany roztwór przesączono przez sączonek ze szkła spiekanego typu Schott G1, rozlano do butelek infuzyjnych o pojemności 100 ml, które zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami.

Rozpuszczalnik nr 4 i nr IV

Podczas ciągłego mieszania do roztworu alkoholu poliwinylowego dodawano powoli bufor cytrynianowy II, zakonserwowany uprzednio przepisaną ilością środków konserwujących, odpowiednią dla wersji 4 lub IV rozpuszczalnika. Tak otrzymane roztwory przesączono przez sączi ze szkła spiekanego typu Schott G1, rozlano do butelek infuzyjnych o pojemności 100 ml, które zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapsłami.

6.3. Ocena jakościowa rozpuszczalników do 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”

Rozpuszczalniki przeznaczone do sporządzania 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych” zostały poddane ocenie jakościowej bezpośrednio po sporządzeniu oraz w trakcie przechowywania w warunkach testów długoterminowych i przyspieszonych, zgodnie z wytycznymi ICH Q1A(R2) [157]. W odstępach trzymiesięcznych oznaczano pH, ciśnienie osmotyczne rozpuszczalników, a także dodatkowo gęstość i lepkość dla wersji zawierających w składzie alkohol poliwinylowy (wersje 3, III, 4, IV). Ponadto dokonywano oceny przezroczystości i zabarwienia przechowywanych rozpuszczalników.

Warunki przechowywania rozpuszczalników

Rozpuszczalniki przechowywane były w komorach klimatycznych Farmaceutycznej Spółdzielni Pracy „Filofarm” w Bydgoszczy w następujących warunkach:

- ❖ przez okres 6 miesięcy w temperaturze $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, przy wilgotności $75\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$,
- ❖ przez okres 12 miesięcy w temperaturze $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, przy wilgotności $60\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$.

Wyniki przeprowadzonych oznaczeń dla rozpuszczalników bezpośrednio po sporządzeniu oraz w trakcie przechowywania zamieszczono w tabelach 8-10.

Tabela 8. Ocena fizyczna rozpuszczalników do 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych” bezpośrednio po sporządzeniu oraz po 3 i 6 miesiącach przechowywania w temperaturze $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, przy wilgotności $60\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$ (test długoterminowy)

Numer rozpuszczalnika	Rozpuszczalnik świeżo sporządzony po wyjłowieniu				Rozpuszczalnik po 3 miesiącach przechowywania $25^{\circ}\text{C} / 60\% \text{RH}$				Rozpuszczalnik po 6 miesiącach przechowywania $25^{\circ}\text{C} / 60\% \text{RH}$			
	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	$6,21 \pm 0,00$	300 ± 4	-	-	$6,25 \pm 0,01$	306 ± 1	-	-	$6,12 \pm 0,02$	303 ± 2	-	-
2	$6,26 \pm 0,02$	337 ± 4	-	-	$6,24 \pm 0,02$	339 ± 2	-	-	$6,12 \pm 0,02$	334 ± 1	-	-
3	$6,13 \pm 0,01$	343 ± 4	$1,0232 \pm 0,0001$	$7,88 \pm 0,00$	$6,24 \pm 0,02$	339 ± 2	$1,0248 \pm 0,0001$	$8,32 \pm 0,01$	$6,12 \pm 0,02$	334 ± 1	$1,0253 \pm 0,0001$	$8,69 \pm 0,01$
4	$6,17 \pm 0,00$	367 ± 2	$1,0223 \pm 0,0000$	$7,47 \pm 0,00$	$6,09 \pm 0,01$	380 ± 4	$1,0240 \pm 0,0002$	$8,15 \pm 0,00$	$6,03 \pm 0,01$	379 ± 2	$1,0247 \pm 0,0001$	$8,52 \pm 0,01$
I	$6,21 \pm 0,01$	300 ± 4	-	-	$6,25 \pm 0,01$	306 ± 1	-	-	$6,12 \pm 0,02$	303 ± 2	-	-
II	$6,28 \pm 0,02$	342 ± 4	-	-	$6,20 \pm 0,01$	343 ± 4	-	-	$6,17 \pm 0,00$	343 ± 2	-	-
III	$6,13 \pm 0,01$	343 ± 4	$1,0232 \pm 0,0001$	$7,88 \pm 0,00$	$6,24 \pm 0,02$	339 ± 2	$1,0248 \pm 0,0001$	$8,32 \pm 0,01$	$6,12 \pm 0,02$	334 ± 1	$1,0253 \pm 0,0001$	$8,69 \pm 0,01$
IV	$6,13 \pm 0,00$	368 ± 4	$1,0230 \pm 0,0001$	$7,56 \pm 0,00$	$6,11 \pm 0,01$	373 ± 0	$1,0231 \pm 0,0001$	$7,78 \pm 0,00$	$6,09 \pm 0,00$	375 ± 4	$1,0233 \pm 0,0001$	$7,96 \pm 0,00$
Rozpuszczalniki wszystkich wersji bezpośrednio po sporządzeniu i podczas przechowywania przez okres 3 i 6 miesięcy pozostały przezroczyste i bezbarwne.												

Tabela 9. Ocena fizyczna rozpuszczalników do 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych” bezpośrednio po sporządzeniu oraz po 9 i 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 25°C ± 2°C, przy wilgotności 60% RH ± 5%RH (test długoterminowy)

Numer rozpuszczalnika	Rozpuszczalnik świeżo sporządzony po wyjłowieniu				Rozpuszczalnik po 9 miesiącach przechowywania 25°C / 60% RH				Rozpuszczalnik po 12 miesiącach przechowywania 25°C / 60% RH			
	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	6,21 ± 0,01	300 ± 4	-	-	6,11 ± 0,01	306 ± 1	-	-	6,14 ± 0,02	311 ± 2	-	-
II	6,28 ± 0,02	342 ± 4	-	-	6,17 ± 0,02	346 ± 2	-	-	6,14 ± 0,00	346 ± 1	-	-
III	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
IV	6,13 ± 0,00	368 ± 4	1,0230 ± 0,0001	7,56 ± 0,00	6,05 ± 0,00	377 ± 0	1,0230 ± 0,0001	8,40 ± 0,01	6,04 ± 0,00	382 ± 1	1,0231 ± 0,0001	8,57 ± 0,00
Rozpuszczalniki wszystkich wersji bezpośrednio po sporządzeniu i podczas przechowywania przez okres 9 i 12 miesięcy pozostały przezroczyste i bezbarwne.												

Tabela 10. Ocena fizyczna rozpuszczalników do 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych” bezpośrednio po sporządzeniu oraz po 3 i 6 miesiącach przechowywania w temperaturze 40°C ± 2°C, przy wilgotności 75% RH ± 5%RH (test przyspieszony)

Numer rozpuszczalnika	Rozpuszczalnik świeżo sporządzony po wyjłowieniu				Rozpuszczalnik po 3 miesiącach przechowywania 40°C / 75% RH				Rozpuszczalnik po 6 miesiącach przechowywania 40°C / 75% RH			
	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	353 ± 1	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	6,21 ± 0,01	300 ± 4	-	-	6,23 ± 0,02	307 ± 0	-	-	6,09 ± 0,00	306 ± 2	-	-
II	6,28 ± 0,02	342 ± 4	-	-	6,19 ± 0,00	347 ± 2	-	-	6,11 ± 0,00	349 ± 0	-	-
III	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	353 ± 1	1,0238 ± 0,0001	8,68 ± 0,01
IV	6,13 ± 0,00	368 ± 4	1,0230 ± 0,0001	7,56 ± 0,00	6,06 ± 0,00	379 ± 0	1,0237 ± 0,0001	8,06 ± 0,01	6,04 ± 0,00	386 ± 2	1,0239 ± 0,0001	8,51 ± 0,01
Rozpuszczalniki wszystkich wersji bezpośrednio po sporządzeniu i podczas przechowywania przez okres 3 i 6 miesięcy pozostały przezroczyste i bezbarwne.												

6.4. Ocena skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej rozpuszczalników do kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”

Ocena skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej rozpuszczalników została przeprowadzona w 2011 roku w Katedrze i Zakładzie Bakteriologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Materiał do badań stanowiły rozpuszczalniki „przemysłowe” w wersjach nr 2 i nr 4 oraz nr II i nr IV, sporządzone w Katedrze Technologii Postaci Leku Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w Toruniu.

Przed przeprowadzeniem oceny skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej wszystkie rozpuszczalniki przechowywane były w szafach klimatycznych w warunkach testów długoterminowych, zgodnych z wymaganiami EMEA (European Medicines Agency), w oparciu o wytyczne ICH (International Conference on Harmonisation) [157]: $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 60 \% \text{RH} \pm 5 \% \text{RH}$ przez okres 12 miesięcy.

Ocena skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej przeprowadzona została zgodnie z wytycznymi Farmakopei Polskiej VII [18] oraz według procedury, zastosowanej we wcześniejszych badaniach [139]. Badanie przeprowadzono w oparciu o szczepy drobnoustrojów testowych wymienione w Farmakopei Polskiej VII: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404. Dodatkowo włączono do oznaczeń szczepy *Bacillus cereus* oraz *Listeria monocytogenes*.

W tabeli 11 przedstawiono kryterium akceptacji dla testu skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej wg Farmakopei Polskiej VII, wyrażone jako logarytm redukcji liczby zdolnych do życia drobnoustrojów, przeliczone na stopień redukcji komórek w procentach, w stosunku do wartości uzyskanej dla inokulum.

W tabeli 12 i tabeli 13 przedstawiono wyniki testu konserwacji rozpuszczalników dla 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”.

Tabela 11. Kryteria oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej dla preparatów do oczu; zalecana skuteczność przeciwdrobnoustrojowa (kryterium A) wg FP VII

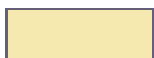
	Sposób przedstawienia wyniku	6h	24h	7 dni	14 dni	28 dni
Bakterie	Log redukcji (FP VII)	2	3	---	---	BW*
	Stopień redukcji komórek (%)	99%	99,90%	---	---	100%
Grzyby	Log redukcji (FP VII)	---	---	2	---	BN**
	Stopień redukcji komórek (%)	---	---	99%	---	

* BW – brak wzrostu zdolnych do życia drobnoustrojów

** 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°C/60 % RH ± 5% RH

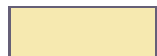
Szczepy testowe	Rozpuszczalnik 2				Rozpuszczalnik 4			
	Stopień redukcji komórek (%)							
	6h	24h	7 dni	28 dni	6h	24h	7 dni	28 dni
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,99%	100%	---	100%	99,99%	100%	---	100%
<i>Staphylococcus aureus</i>	99,95%	99,99%	---	100%	99,99%	100%	---	100%
<i>Candida albicans</i>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



- wynik nie spełniający wymagań FP VII

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°C/60 % RH ± 5% RH

Szczepy testowe	Rozpuszczalnik II				Rozpuszczalnik IV			
	Stopień redukcji komórek (%)							
	6h	24h	7 dni	28 dni	6h	24h	7 dni	28 dni
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,99%	100%	---	100%	99,99%	100%	---	100%
<i>Staphylococcus aureus</i>	99,95%	99,99%	---	100%	99,99%	100%	---	100%
<i>Candida albicans</i>	---	---	100%	100%	---	---	99,99%	100%
<i>Aspergillus niger</i>	---	---	100%	100%	---	---	99,99%	100%
<i>Bacillus cereus</i>	99,99%	99,99%	---	99,99%	99,85%	99,90%	---	99,99%
<i>Listeria monocytogenes</i>	99,94%	100%	---	100%	99,99%	99,99%	---	100%



- wynik nie spełniający wymagań FP VII

7. Czynności przygotowawcze do pracy w warunkach aseptycznych

Roztwory wodne oraz krople do oczu z ceftazydymem sporządzono w warunkach aseptycznych w loży z nawiewem laminarnym jałowego powietrza, używając wyjałowionego sprzętu i jałowych roztworów substancji pomocniczych.

7.1. Substancja czynna

Do sporządzenia roztworów wodnych oraz kropli użyto preparatu Biotum – jałowej, handlowej postaci leku, zawierającej pięciowodzian ceftazydymu z dodatkiem węgla sodu, przeznaczonej do sporządzania roztworów do iniekcji domięśniowych i dożylnych.

7.2. Roztwory substancji pomocniczych

Roztwory substancji pomocniczych: bufony cytrynianowe, roztwór alkoholu poliwinylowego oraz roztwór boranu fenylortęciowego sporządzono zgodnie z opisem przedstawionym w punktach 4.1., 4.2. oraz 4.3.1. i wyjałowiono w autoklawie w temperaturze $120^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ przy nadciśnieniu 101,1 kPa przez 20 minut.

7.3. Przygotowanie sprzętu

- ❖ **Sprzęt szklany oraz metalowy** (zlewki, bagietki, butelki, szpatułki, pincety) dokładnie umyto w ciepłej wodzie z detergentem, wypłukano wodą bieżącą i wodą destylowaną. Zawinięto w folię aluminiową, umieszczono w puszcze sterylizacyjnej i wyjałowiono w sterylizatorze powietrznym w temperaturze 180°C przez 30 minut.
- ❖ **Zakraplacze** po umyciu w ciepłej wodzie z detergentem i wypłukaniu wodą bieżącą oraz destylowaną zanurzono w 5% wodnym roztworze chlorku benzalkoniowego, ogrzewano w temperaturze 70°C przez 1 godzinę, po czym odstawiono na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie w warunkach aseptycznych (w loży z nawiewem jałowego powietrza) wypłukano zakraplacze w wodzie jałowej do zaniku piany.

- ❖ **Sączki membranowe:** Oprawki do sączków typu Sartorius umyto w ciepłej wodzie z detergentem, wypłukano wodą bieżącą i destylowaną. Wewnątrz sączków umieszczono membrany filtracyjne Sartorius o średnicy porów 0,22 μm . Po sprawdzeniu szczelności sączki zawinięto w papier pergaminowy, umieszczono w puszcze sterylizacyjnej i wyjałowiono w autoklawie w temperaturze $120^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ przy nadciśnieniu 101,1 kPa przez 20 minut.

- ❖ **Korki gumowe** do butelek infuzyjnych umyto w ciepłej wodzie z detergentem, wypłukano wodą bieżącą i destylowaną. Zanurzone w wodzie destylowanej wyjałowiono w autoklawie w temperaturze $120^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ przy nadciśnieniu 101,1 kPa przez 20 minut.

7.4. Łoża do pracy aseptycznej

Przed przystąpieniem do pracy wewnętrzne powierzchnie łoży umyto ciepłym roztworem detergentu, wodą, a następnie przetarto 1% roztworem chlorku benzalkoniowego. W łoży umieszczono wszystkie niezbędne utensylia oraz surowce. Włączono nawiew jałowego powietrza oraz lampy UV. Po 30 minutach wyłączono lampy UV i przystąpiono do pracy.

8. Roztwory wodne oraz krople do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych, skład, sporządzanie

8.1. Skład recepturowy roztworów wodnych i kropli do oczu z ceftazydymem

Skład 1% i 5% roztworów wodnych oraz kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych przedstawiono w tabeli 14.

Tabela 14. Skład 1% i 5% wodnych roztworów i kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych

Składniki na 100 g kropli	Symbol wersji									
	1% krople					5% krople				
	0 _(1%)	1R	2R	3R	4R	0 _(5%)	IR	IIR	IIIR	IVR
Ceftazydym	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
w przeliczeniu na preparat Biotum*	1,259	1,259	1,259	1,259	1,259	6,295	6,295	6,295	6,295	6,295
Woda do iniekcji	99,00	-	-	-	-	95,00	-	-	-	-
Bufor cytrynianowy I	-	99,00	96,1	-	-	-	95,00	92,1	-	-
Bufor cytrynianowy II	-	-	-	49,5	48,05	-	-	-	47,5	46,05
Roztwór PVA $\eta = 42,11 \text{ mPa}\cdot\text{s}$	-	-	-	49,5	48,05	-	-	-	47,5	46,05
0,04% roztwór boranu fenylortęciowego	-	-	2,5	-	2,5	-	-	2,5	-	2,5
Alkohol β -fenyloetylowy	-	-	0,4	-	0,4	-	-	0,4	-	0,4

* podane ilości preparatu Biotum odpowiadają przykładowej serii Biotum: 5010607A.

W przypadku zastosowania innych serii Biotum, ilość preparatu modyfikowana była w oparciu o oznaczoną zawartość ceftazydymu w danej serii Biotum (punkt 11.5.1.).

8.2. Uzasadnienie składu recepturowego wodnych roztworów i kropli do oczu z ceftazydymem

Uzasadnienie składu recepturowego wodnych roztworów i kropli do oczu z ceftazydymem przedstawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Uzasadnienie składu recepturowego wodnych roztworów i kropli do oczu z ceftazydymem

Wersje recepturowe	Cel sporządzenia
0_(1%) i 0_(5%)	<p>Ocena trwałości fizykochemicznej 1% i 5% wodnych roztworów ceftazydymu, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C przez okres 30 dni.</p> <p>Uzyskane wyniki analiz stanowiły podstawę do zastosowania w składzie kropli buforu cytrynianowego a także były odnośnikiem w ocenie wpływu poszczególnych składników kropli na ich właściwości fizyczne i trwałość chemiczną.</p>
1R i IR	<p>Ocena wpływu zastosowanych buforów cytrynianowych na trwałość fizykochemiczną 1% i 5% niekonserwowanych kropli z ceftazydymem, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C przez okres 30 dni.</p>
2R i IIR	<p>Ocena wpływu zastosowanych środków konserwujących: boranu fenylortęciowego i alkoholu β-feniloetylowego na trwałość fizykochemiczną 1% i 5% buforowanych kropli z ceftazydymem, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C przez okres 30 dni.</p>
3R i IIR	<p>Ocena wpływu alkoholu poliwinylowego, jako środka zwiększającego lepkość, na trwałość fizykochemiczną 1% i 5% niekonserwowanych kropli z ceftazydymem, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C przez okres 30 dni.</p>
4R i IVR	<p>Ocena wpływu alkoholu poliwinylowego, jako środka zwiększającego lepkość, na trwałość fizykochemiczną 1% i 5% buforowanych i konserwowanych kropli z ceftazydymem, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C przez okres 30 dni.</p>

8.3. Tok postępowania przy sporządzaniu roztworów wodnych oraz kropli do oczu z ceftazydymem

1% i 5% roztwory wodne oraz krople do oczu z ceftazydymem zostały sporządzone zgodnie ze składem recepturowym, podanym w tabeli 14, według opisanych poniżej procedur, właściwych dla danej wersji.

❖ 1% i 5% wodne roztwory ceftazydymu (wersje nr 0_(1%) i nr 0_(5%))

W warunkach aseptycznych odważono do jałowej zlewki preparat Biotum w ilości odpowiadającej 1,0 g lub 5,0 g bezwodnego ceftazydymu. Następnie dodano przepisaną ilość wody do iniekcji i wymieszano do rozpuszczenia substancji. Otrzymany roztwór przesączono przez sącze membranowy o średnicy porów $0,22 \mu\text{m} \pm 0,01 \mu\text{m}$ do jałowych butelek infuzyjnych o pojemności 100 ml, które następnie zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami.

❖ 1% i 5% buforowane krople do oczu z ceftazydymem (wersje nr 1R i IR)

W warunkach aseptycznych odważono do jałowej zlewki preparat Biotum w ilości odpowiadającej 1,0 g lub 5,0 g bezwodnego ceftazydymu. Następnie dodano przepisaną ilość buforu cytrynianowego I i wymieszano do rozpuszczenia substancji. Otrzymane krople przesączono przez sącze membranowy o średnicy porów $0,22 \mu\text{m} \pm 0,01 \mu\text{m}$ do jałowych butelek infuzyjnych o pojemności 100 ml, które następnie zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami.

❖ 1% i 5% buforowane i konserwowane krople do oczu z ceftazydymem (wersje nr 2R i IIR)

W warunkach aseptycznych odważono do jałowej zlewki preparat Biotum w ilości odpowiadającej 1,0 g lub 5,0 g bezwodnego ceftazydymu. Następnie dodano przepisaną ilość buforu cytrynianowego I, wymieszano do rozpuszczenia substancji i zakonserwowano 0,04% roztworem pomocniczym boranu fenylortęciowego oraz alkoholem β -fenyloetylowym.

Otrzymane krople przesączono przez sączonek membranowy o średnicy porów $0,22 \mu\text{m} \pm 0,01 \mu\text{m}$ do jałowych butelek infuzyjnych o pojemności 100 ml, które następnie zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami.

❖ **1% i 5% buforowane krople do oczu z ceftazydymem o zwiększonej lepkości (wersje nr 3R i IIR)**

W warunkach aseptycznych odważono do jałowej zlewki preparat Biotum w ilości odpowiadającej 1,0 g lub 5,0 g bezwodnego ceftazydymu. Następnie dodano przepisana ilość buforu cytrynianowego II, wymieszano do rozpuszczenia substancji i przesączono przez sączonek membranowy o średnicy porów $0,22 \mu\text{m} \pm 0,01 \mu\text{m}$ do jałowej zlewki. Dodano przepisana ilość roztworu PVA o lepkości $\eta = 42,11 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ i wymieszano. Otrzymane krople rozlano do jałowych butelek infuzyjnych o pojemności 100 ml, które następnie zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami.

❖ **1% i 5% buforowane i konserwowane krople do oczu z ceftazydymem o zwiększonej lepkości (wersje nr 4R i IVR)**

W warunkach aseptycznych odważono do jałowej zlewki preparat Biotum w ilości odpowiadającej 1,0 g lub 5,0 g bezwodnego ceftazydymu. Następnie dodano przepisana ilość buforu cytrynianowego II, wymieszano do rozpuszczenia substancji i zakonserwowano 0,04% roztworem pomocniczym boranu fenylortęciowego oraz alkoholem β -fenyloetylowym. Po wymieszaniu przesączono przez sączonek membranowy o średnicy porów $0,22 \mu\text{m} \pm 0,01 \mu\text{m}$ do jałowej zlewki. Dodano przepisana ilość roztworu PVA o lepkości $\eta = 42,11 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ i wymieszano. Otrzymane krople rozlano do jałowych butelek infuzyjnych o pojemności 100 ml, które następnie zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami.



Ryc. 10. Krople do oczu z ceftazydymem bezpośrednio po sporządzeniu (przykładowa wersja 1R)

Każdą wersję recepturową kropli do oczu oraz roztwory wodne ceftazydymu bezpośrednio po sporządzeniu rozdzielono na dwie serie, które były analizowane oddzielnie. Roztwory i krople przechowywano w chłodziarkach farmaceutycznych w temperaturach 4°C i 20°C przez okres 30 dni, chroniąc od światła. Bezpośrednio po sporządzeniu oraz w trakcie przechowywania dokonywano oceny jakościowej roztworów wodnych i kropli z ceftazydymem, w ramach której oznaczano ich trwałość fizyczną i chemiczną.

9. Krople do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, skład, sporządzanie

9.1. Skład 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”

Skład 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych” przedstawiono w tabeli 16.

9.2. Tok postępowania przy sporządzaniu kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”

1% i 5% krople do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych” sporządzono w warunkach aseptycznych zgodnie ze składami podanymi w tabeli 16, przez połączenie preparatu Biotum z przepisaną ilością odpowiedniego rozpuszczalnika i mieszanie do rozpuszczenia. Otrzymane krople rozlano do jałowych butelek infuzyjnych o pojemności 100 ml, które następnie zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami. Każdą wersję „przemysłową” kropli do oczu natychmiast po sporządzeniu rozdzielono na dwie serie, które były przechowywane i oznaczane niezależnie.

Do wykonania kropli użyto rozpuszczalników „przemysłowych” bezpośrednio po ich sporządzeniu oraz rozpuszczalników poddanych uprzednio testowi w warunkach przyspieszonego starzenia: przechowywanych przez okres 6 miesięcy w temperaturze $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75 \text{ RH} \pm 5 \text{ RH}$.

Wszystkie krople przechowywano w chłodziarkach farmaceutycznych w temperaturze 4°C przez okres 30 dni, chroniąc od światła. Bezpośrednio po sporządzeniu oraz w trakcie przechowywania dokonywano oceny jakościowej kropli, w ramach której oznaczano ich trwałość fizyczną i chemiczną.

Tabela 16. Skład 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”

Składniki na 100 g kropli	Symbol wersji**							
	1% krople				5% krople			
	1P0 i 1P6	2P0 i 2P6	3P0 i 3P6	4P0 i 4P6	IP0 i IP6	IIP0 i IIP6	IIIP0 i IIIP6	IVP0 i IVP6
Ceftazydym	1,0	1,0	1,0	1,0	5,0	5,0	5,0	5,0
w przeliczeniu na preparat Biotum*	1,256	1,256	1,256	1,256	6,280	6,280	6,280	6,280
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

*podane ilości preparatu Biotum odpowiadają zastosowanej serii: 5050909 A (oznaczenie zawartości: punkt 11.5.1.)

**w celu odróżnienia wersji kropli wykonanych na bazie rozpuszczalników świeżo sporządzonych od sporządzonych z użyciem rozpuszczalników przechowywanych uprzednio przez okres 6 miesięcy w warunkach testu przyspieszonego starzenia ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75 \text{ RH} \pm 5 \text{ RH}$), wprowadzono następujące oznaczenia wersji kropli:

cyfra arabska	lub	cyfra rzymska	P	cyfra 0	lub	cyfra 6
wersja 1% kropli		wersja 5% kropli	symbol wersji „przemysłowej”	rozpuszczalnik świeżo sporządzony		rozpuszczalnik przechowywany przez okres 6 miesięcy ($40^{\circ}\text{C} / 75 \text{ RH}$)

10. Ocena fizyczna 1% i 5% roztworów wodnych i kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych i „przemysłowych”

10.1. Tożsamość

W badaniach opisanych w niniejszej pracy stosowano ceftazydym z produktu leczniczego o nazwie handlowej Biotum. Użyte serie preparatu znajdowały się w obrocie, dlatego założono, że wymagane przez Farmakopeę badania substancji leczniczej, takie jak badanie tożsamości czy badanie substancji pokrewnych, wykonane zostały przez producenta przed zwolnieniem danych serii do obrotu. Dodatkowo tożsamość ceftazydymu potwierdzona została w ramach oznaczeń specyficzności zastosowanej metody HPLC (punkt 11.5.2.).

Tożsamość 1% i 5% kropli recepturowych oraz „przemysłowych” zgodnie z wytycznymi ICH potwierdzają wyniki analizy chromatograficznej, w tym czas retencji oraz współczynnik retencji, które kontrolowano przez cały czas prowadzonych badań. Przykładowe wyniki przedstawiono w tabeli 39 oraz na rycinach 28 - 41.

❖ Ocena fizyczna

Bezpośrednio po sporządzeniu oraz w trakcie przechowywania, w odstępach trzydniowych, prowadzono ocenę fizyczną roztworów wodnych i kropli, w ramach której oznaczano pH i ciśnienie osmotyczne oraz dodatkowo lepkość dla wersji kropli zawierających w składzie alkohol poliwinylowy. Ponadto prowadzono ocenę organoleptyczną, w ramach której określano przezroczystość, zabarwienie oraz zapach roztworów wodnych i kropli.

10.2. pH kropli

Wyniki pH roztworów wodnych oraz kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych i „przemysłowych” przedstawiono jako wartość średnią z dwóch niezależnie oznaczanych 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% roztworów wodnych oraz kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych, bezpośrednio po sporządzeniu oraz w trakcie przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C przez okres 30 dni, przedstawiono w tabelach 17 i 18.

Wyniki badań pH 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, sporządzonych z użyciem świeżo wykonanych rozpuszczalników, bezpośrednio po sporządzeniu oraz w trakcie przechowywania w temperaturze 4°C przez 30 dni przedstawiono w tabeli 19.

Wyniki badań pH 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, sporządzonych z użyciem rozpuszczalników poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia (40°C / 75 RH) przez okres 6 miesięcy, bezpośrednio po sporządzeniu oraz w trakcie przechowywania w temperaturze 4°C przez okres 30 dni, przedstawiono w tabeli 20.

Tabela 17. pH 1% roztworów wodnych oraz kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4°C oraz 20°C

pH												
wersja recepturowa	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	7,53 ± 0,00	7,52 ± 0,01	7,52 ± 0,01	7,47 ± 0,01	7,44 ± 0,01	7,42 ± 0,01	7,41 ± 0,01	7,37 ± 0,01	7,35 ± 0,01	7,34 ± 0,00	7,30 ± 0,02
	20°C	7,53 ± 0,00	7,51 ± 0,01	7,49 ± 0,01	7,47 ± 0,01	7,43 ± 0,01	7,40 ± 0,01	7,36 ± 0,02	7,23 ± 0,00	7,28 ± 0,01	7,25 ± 0,01	7,24 ± 0,01
1R	4°C	6,32 ± 0,01	6,32 ± 0,01	6,30 ± 0,01	6,31 ± 0,00	6,31 ± 0,01	6,32 ± 0,01	6,30 ± 0,02	6,32 ± 0,02	6,32 ± 0,02	6,30 ± 0,01	6,30 ± 0,01
	20°C	6,32 ± 0,01	6,33 ± 0,00	6,32 ± 0,00	6,32 ± 0,01	6,30 ± 0,01	6,29 ± 0,01	6,33 ± 0,03	6,33 ± 0,01	6,29 ± 0,02	6,31 ± 0,02	6,29 ± 0,01
2R	4°C	6,25 ± 0,01	6,24 ± 0,01	6,25 ± 0,00	6,22 ± 0,01	6,24 ± 0,01	6,23 ± 0,01	6,24 ± 0,01	6,22 ± 0,01	6,23 ± 0,01	6,24 ± 0,01	6,25 ± 0,01
	20°C	6,25 ± 0,01	6,25 ± 0,00	6,25 ± 0,01	6,24 ± 0,01	6,25 ± 0,01	6,24 ± 0,00	6,24 ± 0,01	6,23 ± 0,02	6,23 ± 0,03	6,25 ± 0,01	6,23 ± 0,01
3R	4°C	6,30 ± 0,00	6,31 ± 0,00	6,31 ± 0,01	6,30 ± 0,00	6,29 ± 0,01	6,29 ± 0,01	6,29 ± 0,02	6,28 ± 0,01	6,28 ± 0,00	6,29 ± 0,01	6,29 ± 0,01
	20°C	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,01	6,30 ± 0,00	6,29 ± 0,00	6,30 ± 0,02	6,27 ± 0,00	6,28 ± 0,01	6,28 ± 0,01	6,26 ± 0,01	6,27 ± 0,01	6,27 ± 0,02
4R	4°C	6,21 ± 0,01	6,21 ± 0,01	6,21 ± 0,01	6,21 ± 0,01	6,21 ± 0,01	6,19 ± 0,00	6,20 ± 0,01	6,19 ± 0,01	6,20 ± 0,01	6,21 ± 0,01	6,20 ± 0,01
	20°C	6,21 ± 0,01	6,21 ± 0,02	6,21 ± 0,01	6,20 ± 0,01	6,21 ± 0,00	6,22 ± 0,01	6,21 ± 0,00	6,19 ± 0,01	6,20 ± 0,01	6,19 ± 0,02	6,19 ± 0,02

Tabela 18. pH 5% roztworów wodnych oraz kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4°C oraz 20°C

pH												
wersja recepturowa	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	7,75 ± 0,01	7,59 ± 0,01	7,51 ± 0,01	7,49 ± 0,01	7,49 ± 0,01	7,46 ± 0,01	7,41 ± 0,02	7,38 ± 0,01	7,37 ± 0,02	7,34 ± 0,01	7,35 ± 0,01
	20°C	7,75 ± 0,01	7,69 ± 0,01	7,63 ± 0,01	7,61 ± 0,01	7,58 ± 0,02	7,41 ± 0,01	7,26 ± 0,02	7,19 ± 0,01	7,01 ± 0,02	7,06 ± 0,01	7,05 ± 0,05
IR	4°C	6,48 ± 0,01	6,49 ± 0,00	6,48 ± 0,01	6,46 ± 0,00	6,47 ± 0,01	6,44 ± 0,01	6,44 ± 0,01	6,41 ± 0,01	6,41 ± 0,01	6,41 ± 0,01	6,40 ± 0,01
	20°C	6,48 ± 0,01	6,42 ± 0,00	6,40 ± 0,01	6,39 ± 0,01	6,40 ± 0,01	6,39 ± 0,01	6,38 ± 0,01	6,39 ± 0,01	6,40 ± 0,01	6,38 ± 0,01	6,38 ± 0,01
IIR	4°C	6,36 ± 0,00	6,36 ± 0,01	6,36 ± 0,01	6,33 ± 0,01	6,32 ± 0,02	6,31 ± 0,01	6,33 ± 0,01	6,30 ± 0,01	6,31 ± 0,02	6,29 ± 0,01	6,31 ± 0,02
	20°C	6,36 ± 0,00	6,35 ± 0,01	6,34 ± 0,02	6,32 ± 0,01	6,33 ± 0,01	6,32 ± 0,01	6,32 ± 0,02	6,29 ± 0,01	6,30 ± 0,02	6,31 ± 0,01	6,30 ± 0,02
IIIR	4°C	6,43 ± 0,01	6,42 ± 0,01	6,42 ± 0,01	6,43 ± 0,01	6,42 ± 0,01	6,41 ± 0,01	6,40 ± 0,01	6,39 ± 0,01	6,38 ± 0,01	6,38 ± 0,01	6,36 ± 0,01
	20°C	6,43 ± 0,01	6,43 ± 0,01	6,43 ± 0,02	6,41 ± 0,01	6,39 ± 0,01	6,36 ± 0,01	6,36 ± 0,01	6,35 ± 0,00	6,34 ± 0,01	6,31 ± 0,01	6,33 ± 0,01
IVR	4°C	6,35 ± 0,00	6,36 ± 0,01	6,34 ± 0,02	6,35 ± 0,01	6,34 ± 0,01	6,32 ± 0,02	6,30 ± 0,01	6,28 ± 0,00	6,28 ± 0,00	6,27 ± 0,00	6,27 ± 0,01
	20°C	6,35 ± 0,00	6,36 ± 0,01	6,34 ± 0,01	6,35 ± 0,01	6,34 ± 0,01	6,32 ± 0,01	6,31 ± 0,01	6,29 ± 0,01	6,28 ± 0,00	6,29 ± 0,01	6,27 ± 0,01

Tabela 19. pH 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, przechowywanych w temperaturze 4°C, wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników

pH											
wersja	dzień 0	dzień 3	dzień 6	dzień 9	dzień 12	dzień 15	dzień 18	dzień 21	dzień 24	dzień 27	dzień 30
1P0	6,30 ± 0,00	6,31 ± 0,01	6,31 ± 0,01	6,30 ± 0,01	6,28 ± 0,00	6,29 ± 0,01	6,29 ± 0,01	6,27 ± 0,00	6,28 ± 0,01	6,28 ± 0,01	6,27 ± 0,02
2P0	6,26 ± 0,01	6,27 ± 0,01	6,26 ± 0,01	6,26 ± 0,01	6,25 ± 0,01	6,24 ± 0,01	6,24 ± 0,00	6,24 ± 0,01	6,23 ± 0,01	6,23 ± 0,01	6,22 ± 0,01
3P0	6,25 ± 0,00	6,25 ± 0,01	6,24 ± 0,01	6,25 ± 0,01	6,24 ± 0,00	6,23 ± 0,01	6,24 ± 0,01	6,25 ± 0,01	6,23 ± 0,00	6,24 ± 0,00	6,24 ± 0,01
4P0	6,20 ± 0,01	6,20 ± 0,00	6,18 ± 0,01	6,18 ± 0,01	6,19 ± 0,01	6,17 ± 0,01	6,17 ± 0,01	6,18 ± 0,01	6,17 ± 0,01	6,16 ± 0,01	6,17 ± 0,01
IP0	6,43 ± 0,00	6,40 ± 0,01	6,41 ± 0,01	6,39 ± 0,01	6,40 ± 0,00	6,38 ± 0,01	6,37 ± 0,01	6,38 ± 0,01	6,38 ± 0,01	6,36 ± 0,00	6,36 ± 0,01
IIP0	6,39 ± 0,01	6,40 ± 0,00	6,39 ± 0,01	6,38 ± 0,01	6,38 ± 0,01	6,37 ± 0,01	6,36 ± 0,01	6,37 ± 0,01	6,37 ± 0,02	6,37 ± 0,02	6,35 ± 0,01
IIIP0	6,56 ± 0,01	6,56 ± 0,00	6,55 ± 0,01	6,51 ± 0,01	6,50 ± 0,00	6,51 ± 0,01	6,48 ± 0,01	6,46 ± 0,01	6,46 ± 0,02	6,43 ± 0,02	6,41 ± 0,03
IVP0	6,41 ± 0,01	6,42 ± 0,00	6,41 ± 0,01	6,39 ± 0,01	6,39 ± 0,01	6,38 ± 0,01	6,38 ± 0,01	6,37 ± 0,01	6,35 ± 0,01	6,34 ± 0,01	6,33 ± 0,01

Tabela 20. pH 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, przechowywanych w temperaturze 4°C, sporządzonych z użyciem rozpuszczalników, poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia

pH											
wersja	dzień 0	dzień 3	dzień 6	dzień 9	dzień 12	dzień 15	dzień 18	dzień 21	dzień 24	dzień 27	dzień 30
1P6	6,20 ± 0,00	6,19 ± 0,00	6,20 ± 0,01	6,19 ± 0,01	6,18 ± 0,01	6,17 ± 0,01	6,18 ± 0,00	6,18 ± 0,01	6,18 ± 0,01	6,17 ± 0,01	6,18 ± 0,00
2P6	6,10 ± 0,01	6,08 ± 0,00	6,08 ± 0,01	6,06 ± 0,01	6,04 ± 0,01	6,03 ± 0,01	6,03 ± 0,01	6,03 ± 0,00	6,03 ± 0,02	6,02 ± 0,02	6,03 ± 0,02
3P6	6,06 ± 0,01	6,05 ± 0,00	6,05 ± 0,01	6,03 ± 0,00	6,04 ± 0,00	6,02 ± 0,00	6,02 ± 0,01	6,01 ± 0,01	6,00 ± 0,01	6,01 ± 0,01	6,01 ± 0,01
4P6	6,04 ± 0,01	6,05 ± 0,00	6,04 ± 0,01	6,04 ± 0,01	6,03 ± 0,01	6,02 ± 0,01	6,04 ± 0,01	6,04 ± 0,01	6,02 ± 0,00	6,03 ± 0,02	6,04 ± 0,01
IP6	6,24 ± 0,00	6,24 ± 0,01	6,23 ± 0,01	6,23 ± 0,01	6,22 ± 0,01	6,21 ± 0,02	6,18 ± 0,01	6,22 ± 0,02	6,20 ± 0,01	6,19 ± 0,01	6,20 ± 0,01
IIP6	6,19 ± 0,01	6,19 ± 0,00	6,19 ± 0,01	6,18 ± 0,01	6,16 ± 0,01	6,17 ± 0,01	6,15 ± 0,01	6,16 ± 0,01	6,16 ± 0,02	6,16 ± 0,02	6,15 ± 0,01
IIIP6	6,31 ± 0,01	6,28 ± 0,01	6,28 ± 0,01	6,25 ± 0,01	6,21 ± 0,01	6,21 ± 0,01	6,16 ± 0,01	6,15 ± 0,01	6,16 ± 0,02	6,14 ± 0,01	6,14 ± 0,02
IVP6	6,28 ± 0,00	6,26 ± 0,01	6,26 ± 0,01	6,21 ± 0,01	6,21 ± 0,01	6,16 ± 0,01	6,15 ± 0,01	6,14 ± 0,02	6,15 ± 0,02	6,14 ± 0,01	6,11 ± 0,02

10.3. Ciśnienie osmotyczne

Wyniki oznaczeń ciśnienia osmotycznego roztworów wodnych oraz kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych i „przemysłowych” przedstawiono jako wartość średnią z dwóch niezależnie oznaczanych 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% roztworów wodnych oraz kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych, bezpośrednio po sporządzeniu oraz w trakcie przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C przez okres 30 dni, przedstawiono w tabelach 21 i 22.

Wyniki badań ciśnienia osmotycznego 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, sporządzonych z użyciem świeżo wykonanych rozpuszczalników, bezpośrednio po sporządzeniu oraz w trakcie przechowywania w temperaturze 4°C przez 30 dni, przedstawiono w tabeli 23.

Wyniki badań ciśnienia osmotycznego 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, sporządzonych z użyciem rozpuszczalników poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia (40°C / 75 RH) przez okres 6 miesięcy, bezpośrednio po sporządzeniu oraz w trakcie przechowywania w temperaturze 4°C przez 30 dni, przedstawiono w tabeli 24.

Tabela 21. Ciśnienie osmotyczne 1% roztworów wodnych oraz kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4°C oraz 20°C

Ciśnienie osmotyczne [mOsm/l]												
wersja recepturowa	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	40 ± 1	41 ± 0	40 ± 1	42 ± 1	42 ± 0	43 ± 1	43 ± 1	44 ± 1	45 ± 0	44 ± 1	45 ± 0
	20°C	40 ± 1	41 ± 0	42 ± 1	42 ± 1	44 ± 0	47 ± 1	50 ± 1	52 ± 1	52 ± 0	52 ± 1	52 ± 0
1R	4°C	332 ± 0	330 ± 0	329 ± 0	329 ± 0	331 ± 2	329 ± 1	332 ± 1	332 ± 2	332 ± 1	332 ± 2	334 ± 2
	20°C	332 ± 0	330 ± 2	335 ± 1	335 ± 2	338 ± 2	339 ± 1	341 ± 1	342 ± 3	344 ± 1	346 ± 3	346 ± 1
2R	4°C	358 ± 0	358 ± 1	359 ± 1	360 ± 2	360 ± 0	359 ± 1	362 ± 1	360 ± 2	362 ± 2	363 ± 6	364 ± 2
	20°C	358 ± 0	359 ± 1	359 ± 1	361 ± 2	360 ± 1	362 ± 1	366 ± 1	367 ± 2	368 ± 1	372 ± 2	372 ± 1
3R	4°C	349 ± 1	348 ± 1	350 ± 1	349 ± 2	351 ± 1	350 ± 1	351 ± 1	353 ± 2	353 ± 2	355 ± 3	354 ± 2
	20°C	349 ± 1	353 ± 2	351 ± 1	352 ± 2	353 ± 2	357 ± 2	357 ± 2	359 ± 1	358 ± 1	360 ± 2	361 ± 2
4R	4°C	386 ± 1	387 ± 1	387 ± 1	387 ± 1	388 ± 2	387 ± 2	388 ± 2	390 ± 3	392 ± 2	392 ± 2	393 ± 2
	20°C	386 ± 1	389 ± 2	389 ± 1	391 ± 2	393 ± 2	398 ± 1	398 ± 2	400 ± 1	401 ± 1	402 ± 2	403 ± 2

Tabela 22. Ciśnienie osmotyczne 5% roztworów wodnych oraz kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4°C oraz 20°C

Ciśnienie osmotyczne [mOsm/l]												
wersja recepturowa	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	197 ± 2	198 ± 2	198 ± 1	198 ± 0	200 ± 1	194 ± 1	190 ± 1	190 ± 2	191 ± 1	192 ± 1	193 ± 1
	20°C	197 ± 2	198 ± 1	197 ± 2	200 ± 1	205 ± 3	210 ± 2	216 ± 2	222 ± 2	226 ± 1	227 ± 1	230 ± 2
IR	4°C	475 ± 1	470 ± 1	462 ± 1	465 ± 2	467 ± 2	472 ± 3	479 ± 3	479 ± 3	481 ± 1	481 ± 2	483 ± 1
	20°C	475 ± 1	474 ± 1	475 ± 2	482 ± 2	490 ± 1	497 ± 1	504 ± 2	509 ± 1	516 ± 2	522 ± 2	521 ± 2
IIR	4°C	517 ± 1	517 ± 2	519 ± 1	520 ± 2	520 ± 0	522 ± 1	523 ± 2	522 ± 2	526 ± 1	526 ± 1	527 ± 2
	20°C	517 ± 1	521 ± 1	529 ± 3	534 ± 3	539 ± 1	545 ± 2	551 ± 2	556 ± 2	566 ± 4	573 ± 3	576 ± 2
IIIR	4°C	488 ± 1	487 ± 1	487 ± 1	498 ± 2	492 ± 2	492 ± 2	496 ± 1	498 ± 1	499 ± 2	501 ± 2	499 ± 2
	20°C	488 ± 1	491 ± 2	499 ± 1	505 ± 1	512 ± 1	520 ± 2	523 ± 4	529 ± 2	533 ± 3	534 ± 2	540 ± 3
IVR	4°C	521 ± 1	521 ± 1	522 ± 1	522 ± 2	526 ± 1	525 ± 2	528 ± 2	531 ± 2	533 ± 3	535 ± 1	534 ± 2
	20°C	521 ± 1	530 ± 1	539 ± 2	546 ± 2	551 ± 3	560 ± 1	571 ± 3	578 ± 2	581 ± 2	586 ± 1	592 ± 2

Tabela 23. Ciśnienie osmotyczne 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, przechowywanych w temperaturze 4°C, wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników

Ciśnienie osmotyczne [mOsm/l]											
wersja	dzień 0	dzień 3	dzień 6	dzień 9	dzień 12	dzień 15	dzień 18	dzień 21	dzień 24	dzień 27	dzień 30
1P0	327 ± 1	327 ± 1	328 ± 1	328 ± 2	328 ± 1	330 ± 1	329 ± 1	330 ± 1	332 ± 1	331 ± 2	329 ± 1
2P0	340 ± 1	342 ± 1	343 ± 0	345 ± 1	344 ± 1	346 ± 1	345 ± 1	348 ± 1	353 ± 1	352 ± 1	352 ± 2
3P0	326 ± 0	326 ± 1	325 ± 1	327 ± 1	327 ± 1	326 ± 1	327 ± 1	328 ± 1	330 ± 1	329 ± 1	329 ± 1
4P0	380 ± 1	380 ± 1	382 ± 1	384 ± 1	384 ± 1	385 ± 2	384 ± 1	387 ± 1	389 ± 1	391 ± 1	391 ± 1
IP0	470 ± 1	469 ± 1	471 ± 1	471 ± 1	472 ± 1	472 ± 1	471 ± 1	473 ± 1	474 ± 1	473 ± 1	474 ± 1
IIP0	509 ± 1	510 ± 1	511 ± 1	511 ± 2	511 ± 1	510 ± 1	512 ± 1	513 ± 1	515 ± 1	515 ± 1	515 ± 1
IIIP0	474 ± 0	474 ± 0	474 ± 1	475 ± 1	473 ± 1	474 ± 1	476 ± 1	477 ± 1	480 ± 1	479 ± 1	480 ± 1
IVP0	520 ± 1	521 ± 1	522 ± 1	524 ± 1	523 ± 1	526 ± 1	527 ± 1	528 ± 1	531 ± 1	532 ± 1	532 ± 1

Tabela 24. Ciśnienie osmotyczne 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, przechowywanych w temperaturze 4°C, sporządzonych z użyciem rozpuszczalników, poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia

Ciśnienie osmotyczne [mOsm/l]											
wersja	dzień 0	dzień 3	dzień 6	dzień 9	dzień 12	dzień 15	dzień 18	dzień 21	dzień 24	dzień 27	dzień 30
1P6	331 ± 1	332 ± 1	331 ± 1	332 ± 1	332 ± 1	334 ± 1	333 ± 1	334 ± 1	334 ± 1	335 ± 1	335 ± 1
2P6	342 ± 2	344 ± 1	344 ± 1	344 ± 1	347 ± 1	348 ± 1	349 ± 1	352 ± 1	353 ± 1	353 ± 1	354 ± 2
3P6	338 ± 0	337 ± 1	338 ± 1	339 ± 1	340 ± 1	340 ± 2	339 ± 1	341 ± 1	342 ± 1	341 ± 2	342 ± 2
4P6	396 ± 1	397 ± 1	398 ± 1	401 ± 1	401 ± 1	401 ± 1	402 ± 1	401 ± 1	404 ± 1	403 ± 1	404 ± 1
IP6	479 ± 1	478 ± 1	479 ± 1	479 ± 1	482 ± 1	483 ± 2	481 ± 1	482 ± 0	484 ± 1	483 ± 0	483 ± 1
IIP6	512 ± 0	513 ± 1	513 ± 1	513 ± 1	515 ± 1	516 ± 1	516 ± 1	515 ± 1	517 ± 2	517 ± 1	516 ± 2
IIIP6	488 ± 2	490 ± 1	492 ± 1	492 ± 1	493 ± 2	494 ± 1	493 ± 1	494 ± 1	497 ± 1	499 ± 1	499 ± 1
IVP6	542 ± 1	542 ± 1	541 ± 1	545 ± 1	548 ± 1	549 ± 1	552 ± 1	553 ± 1	556 ± 1	555 ± 1	555 ± 1

10.4. Lepkość

Oznaczenie lepkości zostało przeprowadzone dla wszystkich wersji kropli recepturowych i „przemysłowych”, zawierających w składzie alkohol poliwinylowy. Pomiarów dokonywano przy użyciu wiskozymetru Höpplera w dniu sporządzenia oraz w 30 dniu przechowywania kropli. Dla każdej z dwóch serii danej wersji wykonano po trzy pomiary, wyniki przedstawiono jako wartość średnią i odchylenie standardowe (dla $n = 6$) pojedynczego wyniku.

Wyniki badań lepkości 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach recepturowych bezpośrednio po sporządzeniu oraz w 30 dniu przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C przedstawiono w tabeli 25.

Wyniki badań lepkości 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, sporządzonych z użyciem świeżo wykonanych rozpuszczalników (wersje 3P0 i 4P0 oraz IIP0 i IVP0) bezpośrednio po sporządzeniu oraz w 30 dniu przechowywania kropli w temperaturze 4°C przedstawiono w tabeli 26.

Wyniki badań lepkości 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, sporządzonych z użyciem rozpuszczalników poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia przez okres 6 miesięcy (40°C / 75 RH) (wersje: 3P6 i 4P6 oraz IIP6 i IVP6), bezpośrednio po sporządzeniu oraz w 30 dniu przechowywania kropli w temperaturze 4°C, przedstawiono w tabeli 27.

Tabela 25. Lepkość 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4°C oraz 20°C

wersja kropli	lepkość [mPa·s]		
	dzień 0	dzień 30	
		4°C	20°C
3R	7,82 ± 0,00	7,82 ± 0,00	7,82 ± 0,00
4R	7,48 ± 0,00	7,48 ± 0,00	7,50 ± 0,00
III R	7,70 ± 0,00	7,70 ± 0,00	7,71 ± 0,00
IV R	7,57 ± 0,00	7,57 ± 0,00	7,59 ± 0,00

Tabela 26. Lepkość 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, przechowywanych w temperaturze 4°C, wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników

wersja kropli	lepkość [mPa·s]	
	dzień 0	dzień 30
3P0	7,80 ± 0,00	7,82 ± 0,01
4P0	7,52 ± 0,00	7,52 ± 0,00
III P0	7,67 ± 0,00	7,67 ± 0,00
IV P0	7,48 ± 0,00	7,45 ± 0,00

Tabela 27. Lepkość 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, przechowywanych w temperaturze 4°C, wykonanych z użyciem rozpuszczalników poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia

wersja kropli	lepkość [mPa·s]	
	dzień 0	dzień 30
3P6	8,41 ± 0,00	8,40 ± 0,01
4P6	8,28 ± 0,00	8,26 ± 0,01
III P6	8,49 ± 0,00	8,46 ± 0,01
IV P6	8,29 ± 0,00	8,27 ± 0,01

10.5. Badania organoleptyczne

W ramach badań organoleptycznych określano przezroczystość, zabarwienie oraz zapach roztworów wodnych i kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych i „przemysłowych”, bezpośrednio po sporządzeniu oraz w trakcie przechowywania w temperaturach 4°C i 20°C.

❖ 1% roztwory wodne i krople z ceftazydymem

W dniu sporządzenia 1% roztwory wodne oraz wszystkie 1% wersje kropli były bezbarwne, przezroczyste, o lekkim zapachu antybiotyku, który w przypadku kropli konserwowanych maskowany był zapachem alkoholu β -fenyloetylowego.

Przez cały okres przechowywania wszystkie wersje kropli oraz roztwory wodne ceftazydymu pozostały przezroczyste, niezależnie od temperatury przechowywania. Zaobserwowano natomiast stopniowe żółknięcie wszystkich wersji kropli przechowywanych w temperaturze 20°C oraz jeszcze bardziej intensywne, notowane dla obu temperatur - żółknięcie roztworów wodnych ceftazydymu. W trakcie przechowywania zaobserwowano również pojawianie się charakterystycznego zapachu pirydyny – jednego z produktów rozkładu ceftazydymu. Zmiany zapachu roztworów wodnych i kropli były znacznie bardziej intensywne dla wersji przechowywanych w temperaturze 20°C.

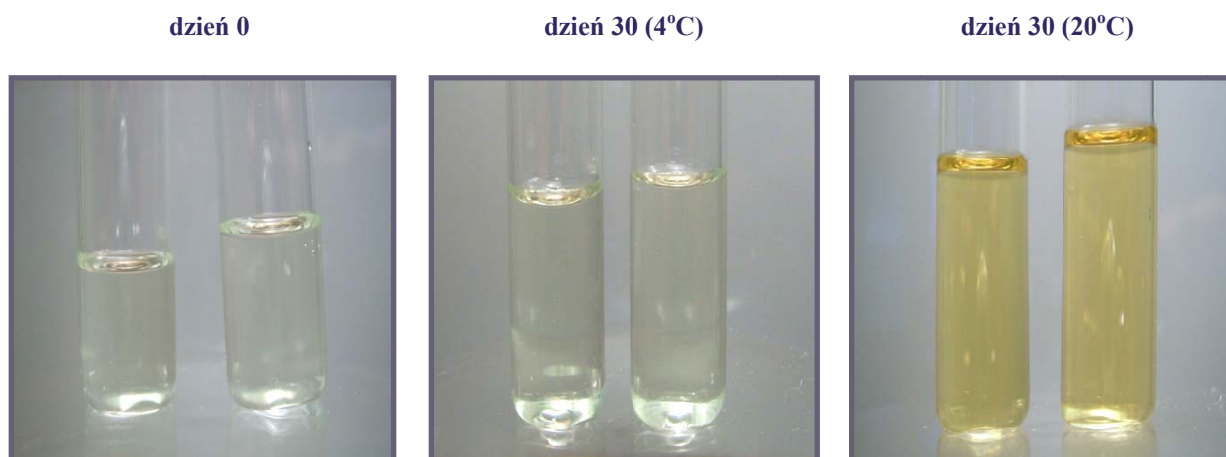


Ryc. 11. Zmiany zabarwienia 1% kropli (przykładowa wersja 1R) w trakcie przechowywania w temperaturach 4°C i 20°C

❖ 5% roztwory wodne i krople z ceftazydymem

W dniu sporządzenia 5% roztwory wodne oraz wszystkie 5% wersje kropli były przezroczyste, miały zabarwienie słomkowe i charakterystyczny zapach antybiotyku, który w przypadku kropli konserwowanych maskowany był zapachem alkoholu β -fenyloetylowego.

Przez cały okres przechowywania wszystkie wersje kropli oraz roztwory wodne ceftazydymu pozostały przezroczyste, niezależnie od temperatury przechowywania. Zaobserwowano natomiast zmiany zabarwienia oraz zapachu, znacznie bardziej intensywne niż dla 1% wersji, zależne od temperatury przechowywania. Największe zmiany odnotowano w roztworach wodnych przechowywanych w temperaturze 20°C.



Ryc. 12. Zmiany zabarwienia 5% kropli (przykładowa wersja IR) w trakcie przechowywania w temperaturach 4°C i 20°C

W okresie trwałości kropli, limitowanym 90% zawartością ceftazydymu (punkt 11.6.4.) krople pozostawały przezroczyste, 1% wersje kropli również bezbarwne, natomiast 5% wersje nieznacznie zmieniły kolor ze słomkowego na jasnożółty. Zapach pirydyny był praktycznie niewyczuwalny (1% wersje) lub bardzo słabo wyczuwalny (5% wersje).

11. Analiza zmian zawartości ceftazydymu w 1% i 5% roztworach wodnych oraz kroplach do oczu w wersjach recepturowych i „przemysłowych”, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C

11.1. Warunki rozdziału chromatograficznego

Analiza zmian zawartości ceftazydymu w roztworach wodnych oraz w kroplach do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych i „przemysłowych” prowadzona była za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z wykorzystaniem elucji izokratycznej. Zastosowana metoda została opracowana w oparciu o monografię *Ceftazidime* USP 29 [158]. Zmodyfikowano skład fazy ruchomej poprzez zwiększenie ilości acetonitrylu o 100% w odniesieniu do ilości zalecanej przez USP 29. Podstawą do modyfikacji metody farmakopealnej był brak powtarzalności czasu retencji dla ceftazydymu.

Parametry zastosowanej metody przedstawiono w tabeli 28.

Tabela 28. Warunki rozdziału chromatograficznego

Kolumna	RP 18; 4,6 mm×150 mm
Faza ruchoma	bufor fosforanowy pH 7,0 100,0 g acetonitryl 40,0 ml* woda ultraczysta do 1000,0 g
Przepływ fazy ruchomej	1,5 ml/min
Objętość nastrzyku	20 µl
Marker czasu martwego	uracyl
Długość fali detektora	254 nm
Temperatura	25°C, stała w czasie całego procesu analizy (kolumna jest termostatowana)
Typ elucji	izokratyczna

* wg USP 29 ilość acetonitrylu = 20,0 ml

11.2. Sporządzenie fazy ruchomej

✓ Skład fazy ruchomej

Acetonitryl	40,0 ml = 31,2 g	(gęstość acetonitrylu = <u>0,786</u> g/cm ³)
Bufor fosforanowy pH 7,0	100,0 g	
Woda ultraczysta	do 1000,0 g	

Tok postępowania

Faza ruchoma sporządzana była wagowo. Do wytarowanej zlewki odważono 100,0 g buforu fosforanowego* pH 7,0 oraz 31,2 g acetonitrylu, zmieszano i uzupełniono wodą ultraczystą do 1000,0 g. Po dokładnym wymieszaniu całość przesączono przez sączonek do faz ruchomych z politetrafluoroetyleny – Millipore o średnicy porów 0,45 μm do jałowych butelek z ciemnego szkła i odgazowano przy użyciu myjki ultradźwiękowej.

* Sporządzenie buforu fosforanowego pH 7,0

Skład

Disodu wodorofosforan bezwodny (Na ₂ HPO ₄)	4,259 g
Potasu diwodorofosforan (KH ₂ PO ₄)	2,722 g
Woda ultraczysta	do 100,0 g

Tok postępowania

Na wadze analitycznej odważono disodu wodorofosforan bezwodny oraz potasu diwodorofosforan. Składniki osobno rozpuszczono na ciepło w części przepisanej ilości wody ultraczystej. Otrzymane roztwory ochłodzono, połączono i uzupełniono wodą ultraczystą do wymaganej masy.

Bufor fosforanowy zużywany był na bieżąco do sporządzenia fazy ruchomej, lub po przesączeniu przez sączonek do faz ruchomych z politetrafluoroetyleny – Millipore o średnicy porów 0,45 μm do jałowych butelek z ciemnego szkła – przechowywany w temperaturze 4°C maksymalnie przez okres tygodnia. Faza ruchoma sporządzana była zawsze bezpośrednio przed analizą chromatograficzną.

11.3. Analiza ilościowa ceftazydymu – metoda wzorca zewnętrznego

W analizie zawartości ceftazydymu w kroplach do oczu wykorzystano metodę wzorca zewnętrznego. Sporządzono trzy krzywe kalibracyjne, przedstawiające zależność powierzchni pików od stężenia wzorca ceftazydymu (CRS) w wodzie ultraczystej. Każda z krzywych sporządzana była przed rozpoczęciem kolejnego etapu badań. Otrzymane równania krzywych były podstawą do obliczenia stężeń ceftazydymu w oznaczanych roztworach lub kroplach.

Każda z krzywych wzorcowych została wykreślona na podstawie analizy chromatograficznej 6 roztworów wzorcowych ceftazydymu w wodzie ultraczystej o stężeniach zawierających się w przedziale od 25 µg/ml do 150 µg/ml, czyli obejmujących zakres 25% - 150% w odniesieniu do oczekiwanych wyników analizy kropli i roztworów bezpośrednio po sporządzeniu. Każdy z roztworów wzorcowych nastrzykiwany był na kolumnę trzykrotnie.

✓ Sporządzenie roztworów wzorcowych

Na wadze analitycznej odważono z dokładnością do 0,1 mg kolejne naważki wzorca ceftazydymu (*Ceftazidime CRS*), przeniesiono je ilościowo do kolb miarowych o pojemności 50 ml i uzupełniono objętość kolb wodą ultraczystą. Dokładnie wymieszano. Zawartość każdej kolby przeniesiono do zlewki, dodano marker czasu martwego (uracyl) i przesączono przez sączek strzykawkowy Chromafil o średnicy porów 0,45 µm do vialki o pojemności 1,5 ml. Vialki z roztworami umieszczono w autosamplerze. Analizę chromatograficzną prowadzono według punktu 11.1., wykonując dla każdego stężenia wzorca po trzy nastrzyki na kolumnę.

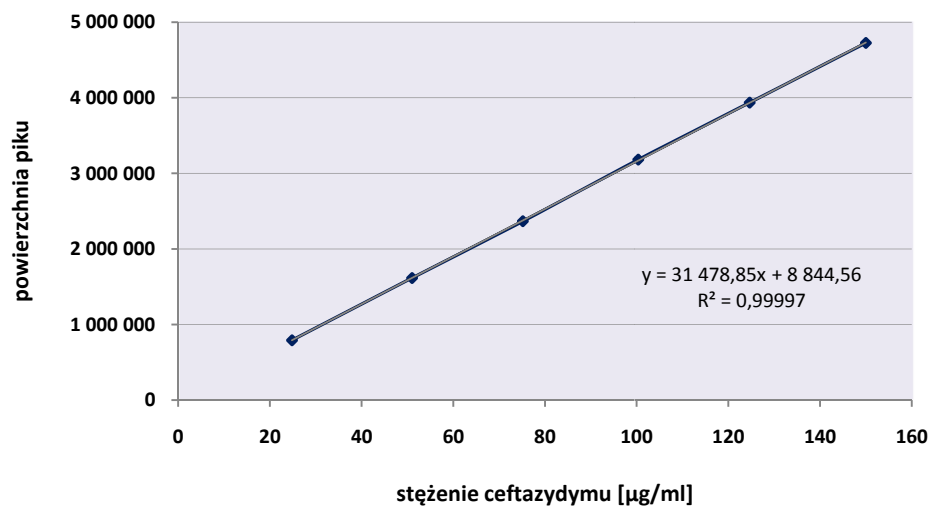
✓ Wykreślenie krzywych kalibracyjnych

Wyniki analiz, na podstawie których wykreślono trzy krzywe kalibracyjne (A, B, C) przedstawiono w tabelach 29-31. Krzywe kalibracyjne przedstawiono na rycinach 13-15.

Krzywa kalibracyjna A

Tabela 29. Zależność powierzchni piku od stężenia ceftazydymu w roztworach wzorcowych dla krzywej kalibracyjnej A

Stężenie roztworu wzorcowego ceftazydymu [µg/ml]	Pole powierzchni piku			Średnie pole powierzchni piku
	1	2	3	
24,83	791462	788492	793209	791054
51,03	1609947	1621921	1611721	1614530
75,17	2355895	2384788	2355523	2365402
100,34	3180187	3208319	3152904	3180470
124,66	3957196	3923257	3927120	3935858
150,00	4749904	4725155	4698657	4724572

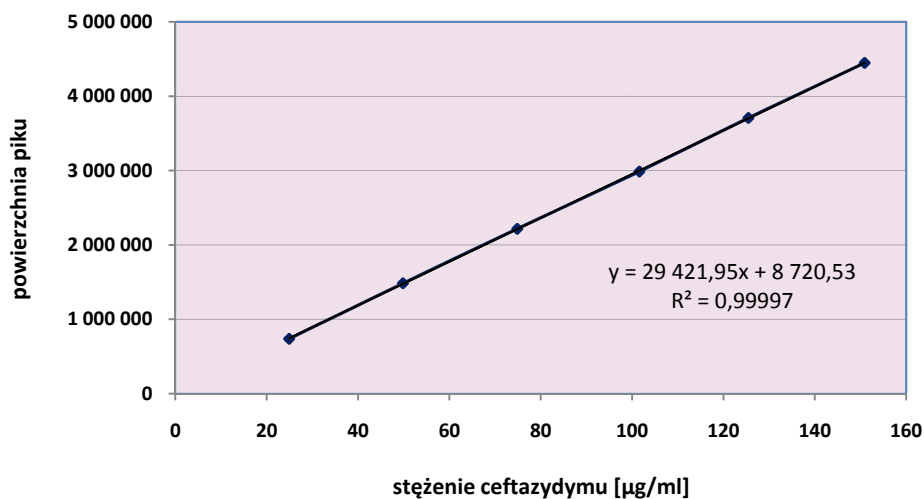


Ryc. 13. Krzywa kalibracyjna A ceftazydymu

Krzywa kalibracyjna B

Tabela 30. Zależność powierzchni piku od stężenia ceftazydymu w roztworach wzorcowych dla krzywej kalibracyjnej B

Stężenie roztworu wzorcowego ceftazydymu [µg/ml]	Pole powierzchni piku			Średnie pole powierzchni piku
	1	2	3	
24,95	736025	735987	738654	736889
49,85	1482146	1470575	1496542	1483088
74,85	2224145	2214074	2209132	2215784
101,59	2987121	2975384	2996903	2986469
125,45	3711774	3706742	3698780	3705765
150,89	4449904	4429155	4461231	4446763

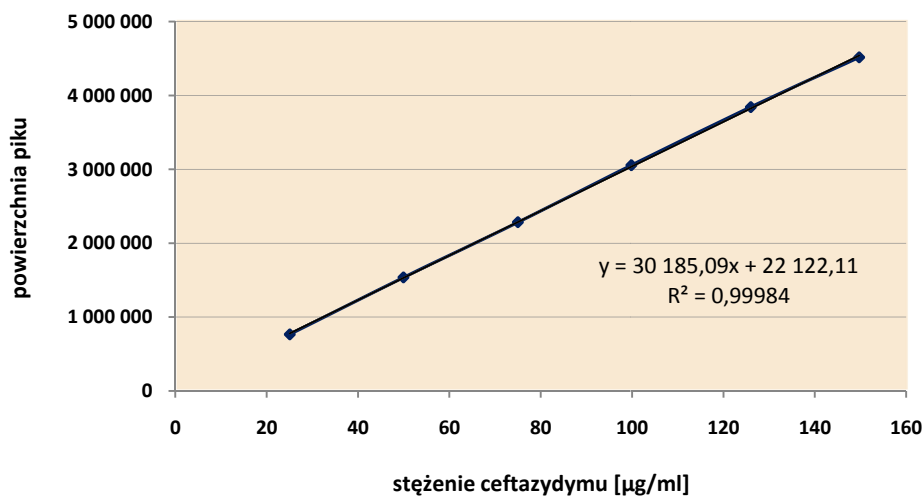


Ryc. 14. Krzywa kalibracyjna B ceftazydymu

Krzywa kalibracyjna C

Tabela 31. Zależność powierzchni piku od stężenia ceftazydymu w roztworach wzorcowych dla krzywej kalibracyjnej C

Stężenie roztworu wzorcowego ceftazydymu [µg/ml]	Pole powierzchni piku			Średnie pole powierzchni piku
	1	2	3	
25,09	766759	764723	765812	765765
49,96	1538813	1538173	1531843	1536276
75,02	2284570	2286917	2278024	2283170
99,84	3048473	3062751	3052391	3054538
125,97	3839247	3850212	3837267	3842242
149,72	4523254	4512862	4511954	4516023



Ryc. 15. Krzywa kalibracyjna C ceftazydymu

11.4. Statystyczna analiza regresji

Przeprowadzono analizę statystyczną danych, w oparciu o które wykreślono krzywe kalibracyjne ceftazydymu. Dokonano oceny istotności korelacji między zmiennymi oraz oceny istotności regresji [159].

Wyniki przeprowadzonej analizy przedstawiono w tabeli 32.

Tabela 32. Analiza regresji krzywych kalibracyjnych A, B i C ceftazydymu

Parametry oceny	Krzywa wzorcowa A	Krzywa wzorcowa B	Krzywa wzorcowa C
Współczynnik korelacji r	$r = 0,99999 > r_{\alpha,f} = 0,8114$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$), co potwierdza istotność korelacji	$r = 0,99999 > r_{\alpha,f} = 0,8114$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$), co potwierdza istotność korelacji	$r = 0,99992 > r_{\alpha,f} = 0,8114$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$), co potwierdza istotność korelacji
Rozrzut wartości (S^2y)	$S^2y = 77604801,38$	$S^2y = 70531465,23$	$S^2y = 386758488,56$
Odchylenie standardowe (Sy)	$Sy = 8809,36$	$Sy = 8398,30$	$Sy = 19666,18$
Współczynnik regresji a	$a = 31478,85$	$a = 29421,96$	$a = 30185,09$
Błąd standardowy współczynnika regresji a (Sa)	$Sa = 84,53$	$Sa = 79,55$	$Sa = 187,82$
Przedział ufności współczynnika regresji a $a \pm t_{\alpha,f} \cdot Sa$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$)	$31478,85 \pm 234,65$	$29421,96 \pm 220,83$	$30185,09 \pm 521,39$
Istotność współczynnika regresji a ($t = a/Sa$)	$ t = 372,41 > t_{\alpha,f} = 2,776$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$), co potwierdza istotność regresji	$ t = 369,86 > t_{\alpha,f} = 2,776$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$), co potwierdza istotność regresji	$ t = 160,71 > t_{\alpha,f} = 2,776$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$), co potwierdza istotność regresji
Współczynnik regresji b	$b = 8844,67$	$b = 8719,93$	$b = 22122,05$
Błąd standardowy współczynnika regresji b (Sb)	$Sb = 8237,28$	$Sb = 7789,82$	$Sb = 18307,55$
Przedział ufności współczynnika regresji b $b \pm t_{\alpha,f} \cdot Sb$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$)	$8844,67 \pm 22866,70$	$8719,93 \pm 21624,53$	$22122,05 \pm 50821,76$
Istotność współczynnika regresji b ($t = b/Sb$)	$ t = 1,07 < t_{\alpha,f} = 2,776$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$), co potwierdza nieistotność współczynnika regresji	$ t = 1,12 < t_{\alpha,f} = 2,776$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$), co potwierdza nieistotność współczynnika regresji	$ t = 1,21 < t_{\alpha,f} = 2,776$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$), co potwierdza nieistotność współczynnika regresji
Postać równania regresji	$y = 31478,85 x$	$y = 29421,96 x$	$y = 30185,09 x$

11.5. Walidacja metody ilościowego oznaczania ceftazydymu w roztworach wodnych oraz kroplach do oczu

Przeprowadzona walidacja metody HPLC oznaczania ceftazydymu w roztworach wodnych oraz w kroplach do oczu obejmowała: specyficzność, liniowość w określonym przedziale stężeń, limity wykrywalności i oznaczalności, dokładność, precyzję oraz oznaczenie *Robustness* [160].

11.5.1. Oznaczenie zawartości ceftazydymu w preparacie Biotum

Z uwagi na fakt, że preparat Biotum zawiera w składzie ceftazydym z dodatkiem węglanu sodu - przed wykonaniem walidacji metody HPLC i przed sporządzeniem kropli oznaczono zawartość ceftazydymu w preparacie Biotum. Zawartość ceftazydymu oznaczana była również każdorazowo przy zastosowaniu nowej serii Biotum.

W badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy zastosowano trzy serie Biotum:

Seria Biotum	Wersje roztworów i kropli do oczu sporządzone z zastosowaniem danej serii Biotum
5010607A	Roztwory wodne i krople w wersjach recepturowych o niemodyfikowanej lepkości wersje: 0 ₁ %, 1R, 2R, 0 ₅ %, IR, IIR,
5020708 A	Roztwory wodne i krople w wersjach recepturowych o modyfikowanej lepkości wersje: 3R, 4R, IIIR, IVR
5050909 A	Krople w wersjach „przemysłowych” wersje: 1P0, 2P0, 3P0, 4P0, IP0, IIP0, IIIP0, IVP0 1P6, 2P6, 3P6, 4P6, IP6, IIP6, IIIP6, IVP6

Zawartość ceftazydymu oznaczono, poddając analizie chromatograficznej wodne roztwory preparatu Biotum o znanych stężeniach (dla każdej serii Biotum po 3 stężenia). Analizę chromatograficzną prowadzono zgodnie z parametrami podanymi w punkcie 11.1., wykonując dla każdej próby po trzy nastrzyki na kolumnę. Zawartość ceftazydymu w zastosowanych w badaniach seriach preparatu Biotum, liczona z równania regresji odpowiedniej krzywej kalibracyjnej ceftazydymu, przedstawiono w tabeli 33.

Tabela 33. Zawartość ceftazydymu w preparacie Biotum

Seria Biotum	Zawartość ceftazydymu w preparacie Biotum [%]	Ilość Biotum [g] równoważna 1 g ceftazydymu
5010607 A	79,43	1,259
5020708 A	79,54	1,257
5050909 A	79,61	1,256

11.5.2. Specyficzność

Metoda analityczna jest specyficzna, jeśli umożliwia oznaczenie analizowanej substancji w obecności innych, obecnych w próbce, np. substancji pomocniczych. W przypadku metody HPLC składniki próbki nie mogą generować sygnału detektora, który zakłócałby sygnał generowany przez oznaczane substancje - nie mogą być one eluowane z kolumny chromatograficznej w czasie retencji ceftazydymu. Współczynnik R_s - rozdzielczość pików (*Resolution*) - dla oznaczeń ilościowych powinien być większy od 1,5 [161].

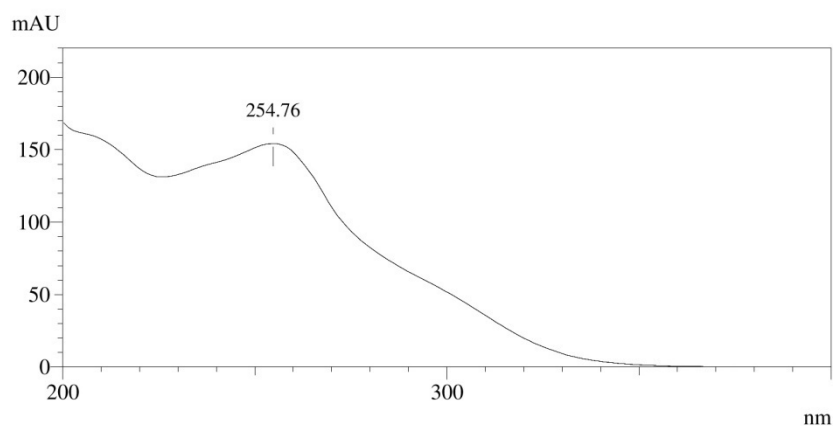
W celu wykazania specyficzności chromatograficznej metody oznaczania ceftazydymu w roztworach wodnych oraz w kroplach do oczu przeprowadzono analizę chromatograficzną (według punktu 11.1.) następujących roztworów:

- ❖ roztworu wzorca ceftazydymu (CRS) w wodzie ultraczystej,
- ❖ roztworu ceftazydymu (Biotum) w wodzie ultraczystej,
- ❖ roztworu ceftazydymu (Biotum) w wodzie ultraczystej z dodatkiem wzorca ceftazydymu (CRS),
- ❖ roztworów wszystkich zastosowanych w technologii kropli substancji pomocniczych:
 - cytrynianu sodu,
 - kwasu cytrynowego,
 - alkoholu poliwinylowego,
 - boranu fenylortęciowego,
 - alkoholu β -fenyloetylowego,

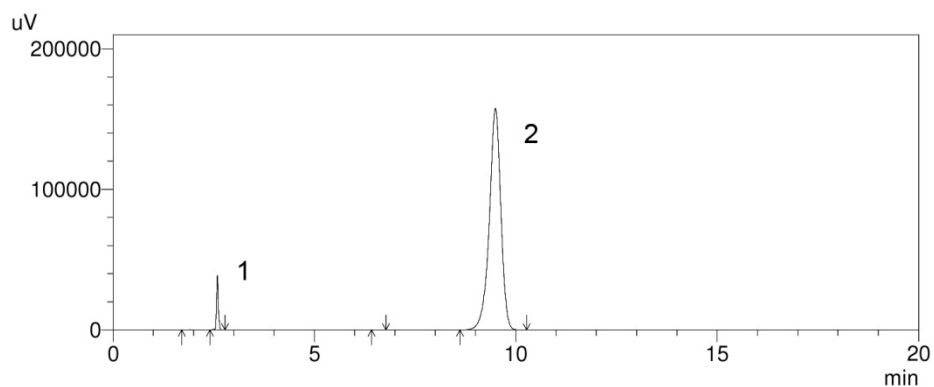
- ❖ roztworu pirydyny (wzorzec do chromatografii gazowej), jako produktu rozkładu ceftazydymu, który był oznaczany obok ceftazydymu w roztworach wodnych i kroplach do oczu.

Stężenia analizowanych substancji dobrano w taki sposób, aby odpowiadały ich najwyższym stężeniom, oznaczanym w toku analizy kropli do oczu z ceftazydymem.

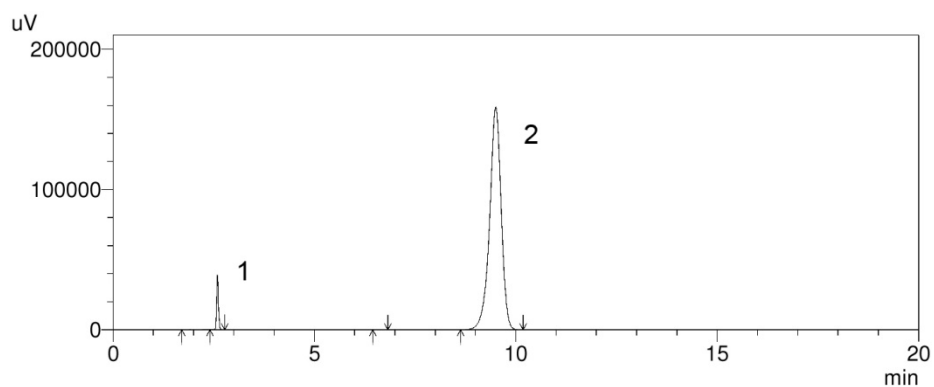
Chromatogramy powyższych roztworów przedstawiono na rycinach 17 - 24 i 26. Dodatkowo przedstawiono widma UV w zakresie długości fali 200 - 400 nm dla: ceftazydymu (Ryc. 16), pirydyny (Ryc. 27), oraz alkoholu β -fenyloetylowego (Ryc. 25), który jako jedyny z zastosowanych substancji pomocniczych wykazywał absorpcję przy analitycznej dla ceftazydymu długości fali (254 nm).



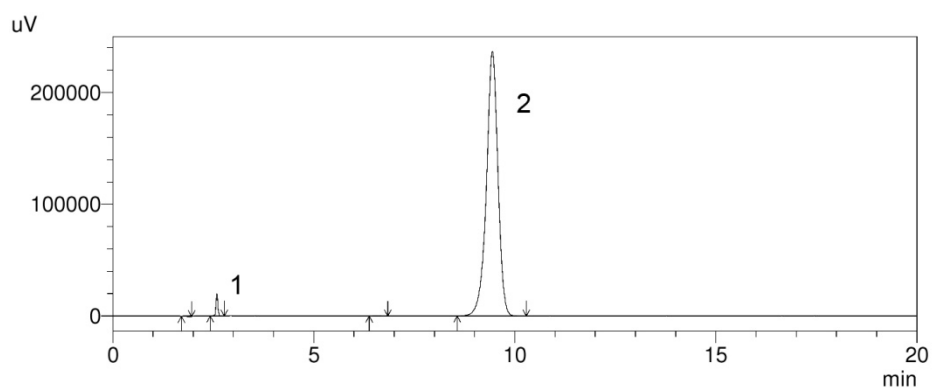
Ryc. 16. Widmo UV ceftazydymu w zakresie długości fali 200 - 400 nm



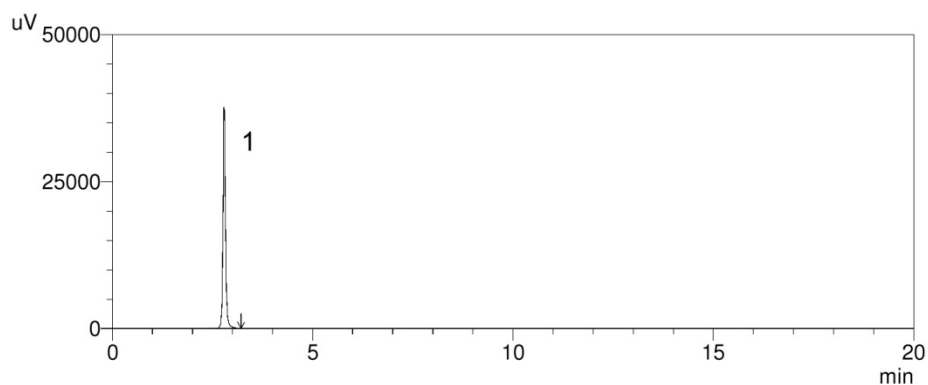
**Ryc. 17. Chromatogram roztworu wzorca ceftazydymu (CRS) o stężeniu w próbce badanej (w nastrzyku) 0,1 mg/ml
1 – pik uracylu, 2 – pik ceftazydymu wzorcowego**



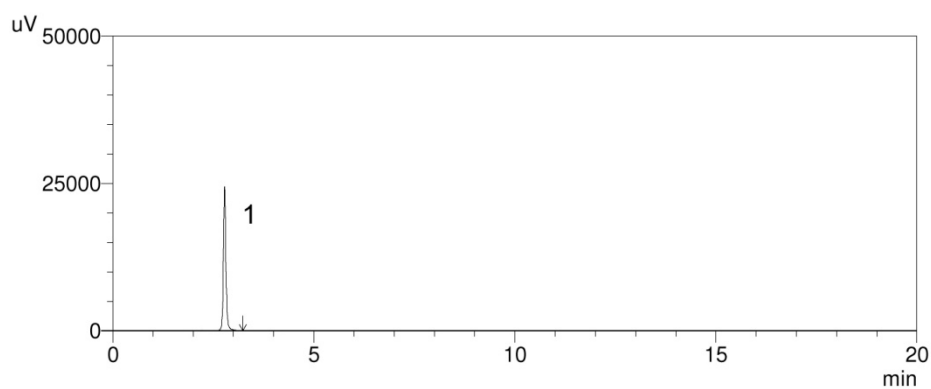
**Ryc. 18. Chromatogram roztworu Biotum o stężeniu ceftazydymu w próbce badanej (w nastrzyku) 0,1 mg/ml
1 – pik uracylu, 2 – pik ceftazydymu z preparatu Biotum**



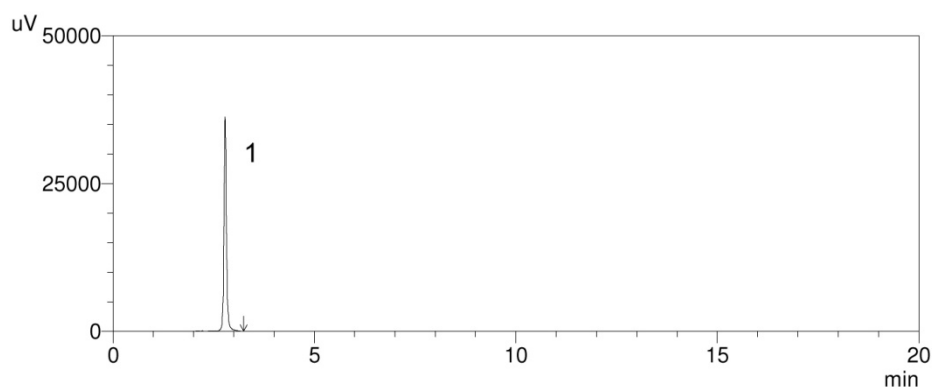
**Ryc. 19. Chromatogram roztworu Biotum z dodatkiem wzorca
1 – pik uracylu, 2 – pik ceftazydymu z preparatu Biotum z ceftazydymem wzorcowym**



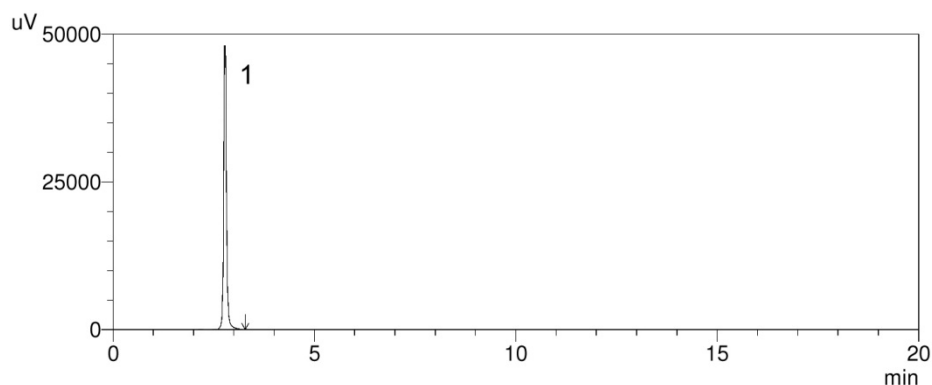
Ryc. 20. Chromatogram roztworu cytrynianu sodu o stężeniu w próbce badanej (w nastrzyku) 0,3 mg/ml
1 – pik uracylu



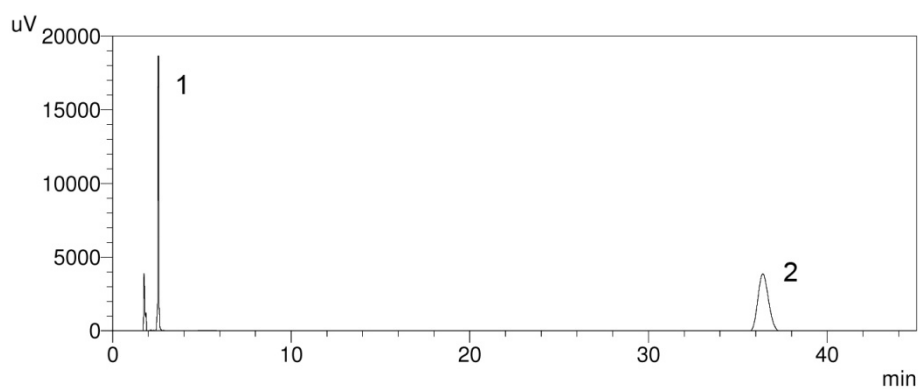
Ryc. 21. Chromatogram roztworu kwasu cytrynowego o stężeniu w próbce badanej (w nastrzyku) 0,015 mg/ml
1 – pik uracylu



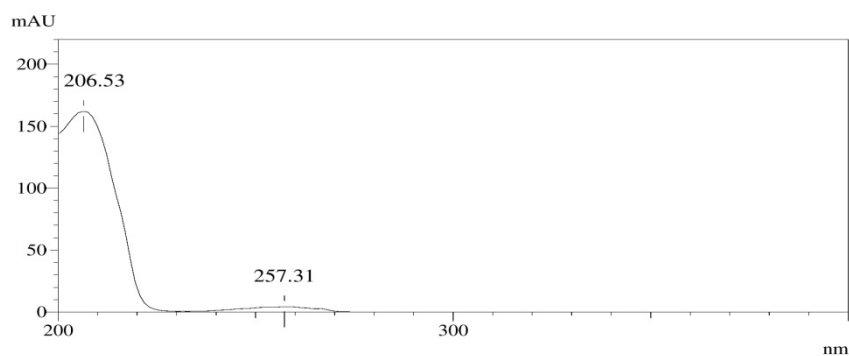
Ryc. 22. Chromatogram roztworu alkoholu poliwinylowego o stężeniu w próbce badanej (w nastrzyku) 0,3 mg/ml
1 – pik uracylu



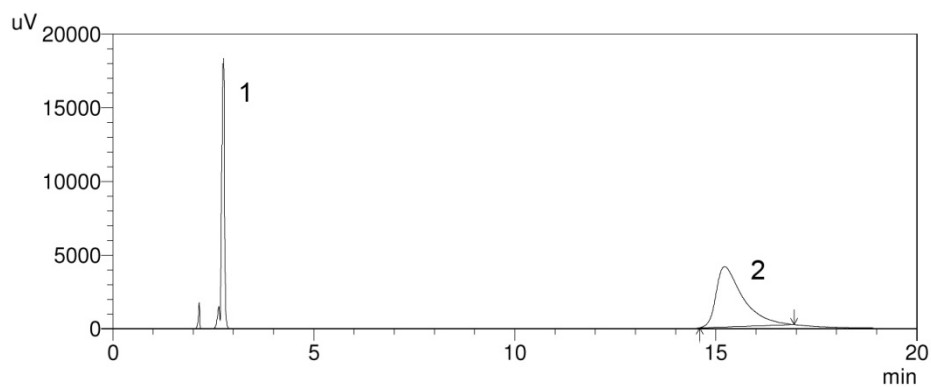
Ryc. 23. Chromatogram roztworu boranu fenylortęciowego o stężeniu w próbce badanej (w nastrzyku) 0,1 $\mu\text{g/ml}$
1 – pik uracylu



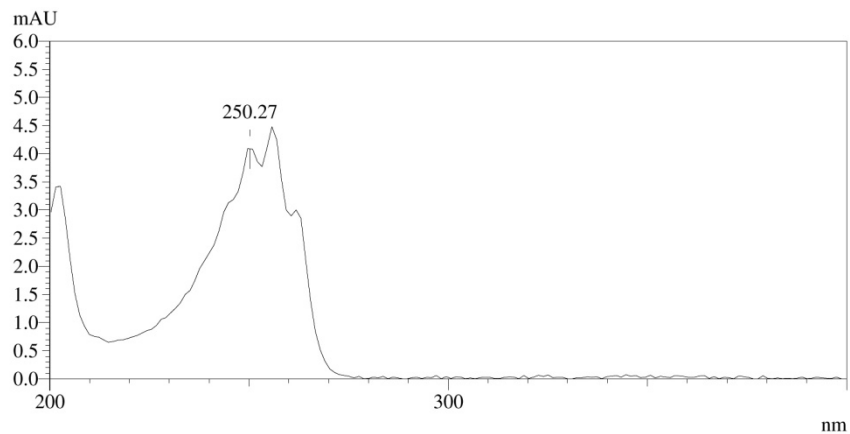
Ryc. 24. Chromatogram roztworu alkoholu β -fenyloetylowego o stężeniu w próbce badanej (w nastrzyku) 0,04 mg/ml
1 – pik uracylu, 2 - pik alkoholu β -fenyloetylowego



Ryc. 25. Widmo UV alkoholu β -fenyloetylowego w zakresie długości fali 200 – 400 nm



**Ryc. 26. Chromatogram roztworu wzorcowego pirydyny o stężeniu w próbce badanej (w nastrzyku) 0,01 mg/ml
1 – pik uracylu, 2 – pik pirydyny**



Ryc. 27. Widmo UV pirydyny w zakresie długości fali 200 – 400 nm

Uzyskane na podstawie analizy powyższych prób dane, w oparciu o które potwierdzono specyficzność metody, zebrano w tabeli 34.

Tabela 34. Ocena specyficzności metody HPLC

Analit	Sygnal detektora *	Czas retencji t_R [min]	Współczynnik retencji k	Rozdzielczość pików R_s
Ceftazydym (wzorzec CRS)	+	9,498	2,671	1,712
Ceftazydym (Biotum)	+	9,490	2,673	1,711
Pirydyna	+	15,222	4,574	1,711
Alkohol β -fenyloetylowy	+	36,398	13,240	2,895
Sodu cytrynian dwuwodny	-	-	-	-
Kwas cytrynowy jednowodny	-	-	-	-
Alkohol poliwinylowy	-	-	-	-
Boran fenylortęciowy	-	-	-	-

* Sygnal detektora: obecność pików (+), brak pików (-)

Przeprowadzone analizy potwierdziły specyficzność zastosowanej w badaniach metody oznaczania ceftazydymu w roztworach wodnych oraz w kroplach do oczu. Żadna z zastosowanych w składzie kropli substancji pomocniczych, oprócz alkoholu β -fenyloetylowego, nie wykazywała absorpcji przy analitycznej dla ceftazydymu długości fali = 254 nm i nie generowała sygnału detektora. Alkohol β -fenyloetylowy wykazywał absorpcję przy długości fali 254 nm (wyznaczone maksimum absorpcji 206,53 nm; Ryc. 55), jednak generował sygnał detektora głównie w przypadku 1% wersji kropli (mniejsze rozcieńczenie prób do analizy HPLC; punkt 11.6.3.). Alkohol β -fenyloetylowy był wymywany z kolumny w czasie retencji około 36 minut. Pomimo faktu, że alkohol β -fenyloetylowy nie interferował z pozostałymi substancjami, analizę chromatograficzną kropli wersji konserwowanych prowadzono do wyeluowania alkoholu β -fenyloetylowego z kolumny, co znacznie wydłużało czas oznaczeń.

Późniejsza analiza trwałości kropli potwierdziła specyficzność metody oznaczania ceftazydymu również w aspekcie powstających w trakcie przechowywania kropli produktów rozkładu: pojawiające się na chromatogramach piki produktów rozkładu ceftazydymu nie interferowały z pikami analitu.

11.5.3. Liniowość metody oznaczania ilościowego ceftazydymu

Liniowość metody, potwierdzająca możliwość otrzymywania wyników wprost proporcjonalnych do stężenia analitu w próbce, została udowodniona dla ceftazydymu w zakresie 25% - 150% w odniesieniu do zawartości wyjściowej ceftazydymu w kroplach do oczu w punktach 11.3. i 11.4. Wartość współczynnika korelacji liniowej (r) wszystkich trzech krzywych kalibracyjnych ceftazydymu była powyżej 0,9999.

11.5.4. Granice wykrywalności i oznaczalności ceftazydymu

Granice wykrywalności (DL) i oznaczalności (QL) ceftazydymu w próbce badanej (w nastrzyku) określono na podstawie parametrów analizy regresji krzywych kalibracyjnych ceftazydymu według poniższych wzorów [159]. Obliczone wartości DL oraz QL podano dla każdej krzywej kalibracyjnej w tabeli 35.

$$\text{Granica wykrywalności (DL)} = 3,3 \cdot S_y / a$$

$$\text{Granica oznaczalności (QL)} = 10 \cdot S_y / a$$

gdzie:

S_y – odchylenie standardowe

a – współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej

Tabela 35. Granice wykrywalności i oznaczalności ceftazydymu

Krzywa kalibracyjna	A	B	C
DL [$\mu\text{g/ml}$]	0,92	0,94	2,15
QL [$\mu\text{g/ml}$]	2,80	2,84	6,52

11.5.5. Dokładność

Dokładność metody analitycznej określa zgodność pomiędzy wartością rzeczywistą a wartością otrzymaną w wyniku analizy. W niniejszej pracy dokładność oznaczeń ilościowych ceftazydymu wyznaczono na podstawie analizy chromatograficznej mieszanin modelowych dwóch wersji kropli: wersji 3 i III, które zawierały 50%, 75%, 100% lub 125% ceftazydymu w odniesieniu do deklarowanej zawartości antybiotyku w badanych kroplach.

Mieszaniny modelowe odpowiednio dla 1% oraz 5% kropli wykonano przy użyciu rozpuszczalników, które składem jakościowym i ilościowym substancji pomocniczych odpowiadały „przemysłowym” wersjom kropli nr 3P oraz nr IIIP. Mieszaniny modelowe sporządzono wagowo. Na wadze analitycznej odważono określoną ilość ceftazydymu (Biotum) i uzupełniono rozpuszczalnikiem do odpowiedniej masy.

Dla każdej mieszaniny modelowej przygotowano po 6 próbek do nastrzyku wg punktu 11.6.3., odpowiednio dla wersji 3 i III i poddano je analizie chromatograficznej. Za miarę dokładności metody przyjęto procent odzysku, który obliczono ze wzoru:

$$\text{odzysk} = \frac{\text{stężenie oznaczone}}{\text{stężenie obliczone}} * 100\% \quad , \text{gdzie:}$$

stężenie oznaczone - stężenie ceftazydymu, oznaczone metodą HPLC (obliczone na podstawie powierzchni pików z krzywej kalibracyjnej)

stężenie obliczone – stężenie ceftazydymu, obliczone na podstawie masy naważki ceftazydymu i masy sporządzonych mieszanin modelowych kropli [mg/g], przeliczone w oparciu o gęstość mieszanin na stężenie wagowo-objętościowe [g/ml]

Wyniki analizy dokładności oznaczania ceftazydymu w kroplach zebrano w tabelach 36-37.

Tabela 36. Wyniki oceny dokładności metody oznaczania ilościowego ceftazydymu w 1% kroplach do oczu

Numer próbki mieszaniny modelowej 1% kropli		Stężenie ceftazydymu obliczone [mg/g]	Gęstość mieszaniny modelowej w 25°C [g/ml]	Stężenie ceftazydymu obliczone [mg/ml]	Pole powierzchni pików ceftazydymu	Stężenie ceftazydymu oznaczone [mg/g]	Odzysk [%]	Wz [%]
(50%)	1	5,047	1,0256	5,176	1507592	5,124	98,99	
	2				1498103	5,092	98,37	
	3				1500783	5,101	98,55	
	4				1500902	5,101	98,55	
	5				1497827	5,091	98,35	
	6				1499287	5,096	98,45	
wartość średnia ± SD					1500749 ± 3592	5,101 ± 0,012	98,54 ± 0,24	0,24
(75%)	1	7,529	1,0270	7,732	2223819	7,558	97,75	
	2				2217830	7,538	97,49	
	3				2217809	7,538	97,49	
	4				2222784	7,555	97,71	
	5				2225983	7,566	97,85	
	6				2219047	7,542	97,54	
wartość średnia ± SD					2221212 ± 3456	7,550 ± 0,012	97,64 ± 0,15	0,16
(100%)	1	10,015	1,0277	10,292	2975387	10,113	98,25	
	2				2977938	10,121	98,34	
	3				2976481	10,116	98,29	
	4				2972081	10,102	98,15	
	5				2971951	10,101	98,14	
	6				2973017	10,105	98,18	
wartość średnia ± SD					2974475 ± 2493	10,110 ± 0,008	98,22 ± 0,08	0,08
(125%)	1	12,504	1,0280	12,854	3722005	12,650	98,42	
	2				3721125	12,647	98,39	
	3				3720254	12,644	98,37	
	4				3726021	12,664	98,52	
	5				3720215	12,644	98,37	
	6				3724822	12,660	98,49	
wartość średnia ± SD					3722407 ± 2455	12,652 ± 0,008	98,43 ± 0,06	0,07

Tabela 37. Wyniki oceny dokładności metody oznaczania ilościowego ceftazydymu w 5% kroplach do oczu

Numer próbek mieszaniny modelowej 5% kropli		Stężenie ceftazydymu obliczone [mg/g]	Gęstość mieszaniny modelowej w 25°C [g/ml]	Stężenie ceftazydymu obliczone [mg/ml]	Pole powierzchni piku ceftazydymu	Stężenie ceftazydymu oznaczone [mg/g]	Odzysk [%]	Wz [%]
(50%)	1	26,749	1,0301	27,554	1584057	26,920	97,70	
	2				1584852	26,933	97,75	
	3				1578879	26,832	97,38	
	4				1582749	26,897	97,62	
	5				1589470	27,012	98,03	
	6				1576529	26,792	97,23	
wartość średnia ± SD					1582756 ± 4582	26,898 ± 0,078	97,62 ± 0,28	0,29
(75%)	1	37,399	1,0324	38,611	2224039	37,796	97,89	
	2				2206441	37,496	97,11	
	3				2209875	37,555	97,27	
	4				2224598	37,805	97,91	
	5				2213719	37,620	97,43	
	6				2217443	37,683	97,60	
wartość średnia ± SD					2216019 ± 7412	37,659 ± 0,126	97,54 ± 0,33	0,33
(100%)	1	50,305	1,0350	52,066	2967543	50,431	96,86	
	2				2952142	50,169	96,36	
	3				2954891	50,216	96,45	
	4				2957735	50,264	96,54	
	5				2970397	50,479	96,95	
	6				2972959	50,523	97,04	
wartość średnia ± SD					2962611 ± 8775	50,347 ± 0,149	96,70 ± 0,29	0,30
(125%)	1	62,522	1,0355	64,741	3752223	63,766	98,49	
	2				3747395	63,684	98,37	
	3				3750214	63,732	98,44	
	4				3753620	63,789	98,53	
	5				3749531	63,720	98,42	
	6				3759256	63,885	98,68	
wartość średnia ± SD					3752040 ± 4143	63,763 ± 0,070	98,49 ± 0,11	0,11

11.5.6. Precyzja

Precyzja metody analitycznej określa stopień zgodności między wynikami uzyskanymi w określonych warunkach z wielokrotnych pomiarów tej samej wielkości. Precyzję metody oznaczania ceftazydymu w 1% i 5% kroplach do oczu, określoną przez odchylenie standardowe (SD) i procent względnego odchylenia standardowego, czyli współczynnik zmienności (Wz), przedstawiono w tabelach 36 i 37.

11.5.7. Robustness

Analiza *Robustness*, czyli analiza odporności metody, przeprowadzana jest w celu sprawdzenia, czy i w jaki sposób zmiany parametrów metody wpływają na uzyskiwane wyniki analizy. W oparciu o wytyczne ICH [160] rozważono prawdopodobieństwo zmian w trakcie analizy HPLC następujących parametrów: temperatury, pH fazy ruchomej oraz ilości acetonitrylu w fazie ruchomej.

Ponieważ kolumna jest termostатовana, natomiast bufor fosforanowy sporządzany jest wagowo i nie zawiera w składzie lotnych związków, nie było przesłanek do oznaczania odporności metody na zmianę temperatury kolumny lub na zmianę pH fazy ruchomej. Dla prawidłowo wykonanej analizy prawdopodobieństwo zmian powyższych parametrów jest znikome. Natomiast bardzo ważnym parametrem, który mógł ulegać niewielkim zmianom w czasie trwania analizy, była zawartość acetonitrylu w fazie ruchomej. Jest to składnik lotny i w trakcie prowadzenia długotrwałej analizy chromatograficznej mogło dochodzić do zmniejszania się jego stężenia w fazie ruchomej.

Tok postępowania

Zbadano wpływ zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej na wyniki analizy HPLC wodnego roztworu ceftazydymu. Zastosowane w badaniu *Robustness* fazy ruchome zawierały 90%, 100% oraz 110% acetonitrylu w odniesieniu do ilości zastosowanej w analizie kropli. Oznaczenie polegało na trzykrotnym nastrzyknięciu roztworu wzorcowego ceftazydymu, o stężeniu około 100 µg/ml, na wystabilizowaną w danej fazie ruchomej kolumnę. Podczas stabilizacji kolumny na nowe parametry (na nową fazę ruchomą) próba znajdowała się w termostатовanej komorze autosamplera.

Wyniki przeprowadzonej analizy *Robustness* przedstawiono w tabeli 38.

Tabela 38. Wpływ zmiany zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej na czas retencji oraz pole powierzchni piku ceftazydymu na przykładzie analizy roztworu wodnego ceftazydymu

Zmienny parametr	Średnie pole powierzchni piku (n = 3)	Średnie oznaczone stężenie ceftazydymu w roztworze wzorcowym (krzywa kalibracyjna A) [µg/ml]	Średni czas retencji piku [min] (n = 3)
zawartość acetonitrylu			
90%	3122406 ± 2491	99,19 ± 0,08	11,042
100%	3130145 ± 630	99,44 ± 0,02	9,482
110%	3125658 ± 1435	99,29 ± 0,05	8,532
Średnia	3123403 ± 2484	99,22 ± 0,08	
SD	3886	0,08	
Wz [%]	0,13%	0,13%	

11.6. Analiza zmian zawartości ceftazydymu w 1% i 5% roztworach wodnych oraz kroplach do oczu w wersjach recepturowych i „przemysłowych”, tok postępowania analitycznego, wyniki

11.6.1. Materiał do badań

Analizie chromatograficznej poddawano 1% i 5% roztwory wodne oraz 1% i 5% krople do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych i „przemysłowych”, sporządzone zgodnie ze składami podanymi w tabelach 14 i 16, według przepisów przedstawionych w punktach 8.3. i 9.2. Roztwory wodne i krople w wersjach recepturowych i „przemysłowych” przechowywane były w chłodziarkach farmaceutycznych, w temperaturze 4°C. Ponadto wersje recepturowe przechowywano w temperaturze 20°C w celach porównawczych oraz w celu obserwacji „przyspieszonego” rozkładu kropli, co umożliwiło dodatkowe oznaczenie stężenia jednego z produktów rozkładu ceftazydymu – pirydyny.

11.6.2. Czas trwania badań

Analizę chromatograficzną każdej wersji roztworów wodnych i kropli do oczu z ceftazydymem prowadzono bezpośrednio po sporządzeniu oraz w odstępach trzydniowych przez okres 30 dni.

11.6.3. Przygotowanie prób i przeprowadzenie analizy

Próbki roztworów wodnych oraz kropli z ceftazydymem pobierano w warunkach aseptycznych do szklanych probówek przy użyciu jałowej strzykawki z igłą. W celu wykonania analizy HPLC wersje 1% rozcieńczano 100x, wersje 5% rozcieńczano 500x w następujący sposób: do każdej z 3 kolb miarowych o pojemności 50 ml pobierano za pomocą pipety półautomatycznej 0,5 ml (1% wersje) lub 0,1 ml (5% wersje) roztworów wodnych lub kropli. W przypadku kropli przechowywanych w temperaturze 4°C, przed pobraniem do kolb próby termostatowano przez 5 minut w temperaturze 20°C. Do kolb dodawano uracyl, jako marker czasu martwego, objętość kolb uzupełniano wodą ultraczystą i mieszano. Otrzymane próby sączono przez sączek membranowy Chromafil o średnicy porów 0,45 µm do vialek, które umieszczano w autosamplerze i poddawano ich zawartość analizie chromatograficznej. Na kolumnę nastrzykiwano po 20 µl badanych roztworów. Z każdej vialki wykonano po jednym nastrzyku, uzyskując po 3 wyniki dla każdej serii roztworów wodnych lub kropli, czyli po 6 wyników dla każdej badanej wersji. Zawartość ceftazydymu obliczano z równań krzywych kalibracyjnych według punktu 11.6.4.

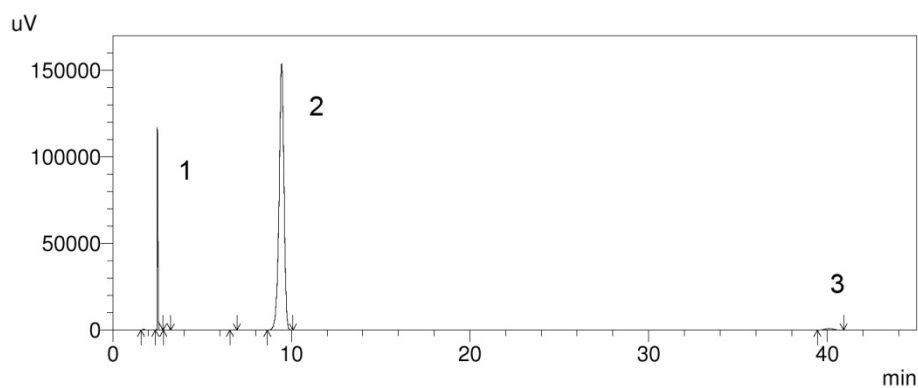
Poddając analizie chromatograficznej roztwory wodne i krople do oczy z ceftazydymem wyznaczano następujące parametry rozdziału chromatograficznego:

- ❖ t_R - czas retencji,
- ❖ k - współczynnik retencji,
- ❖ R_s – rozdzielczość,
- ❖ $N / metr$ - ilość pól teoretycznych na metr
- ❖ TF - współczynnik ogonowania (*Tailing Factor*),
- ❖ **Height** - wysokość piku,
- ❖ **Area** - pole powierzchni piku.

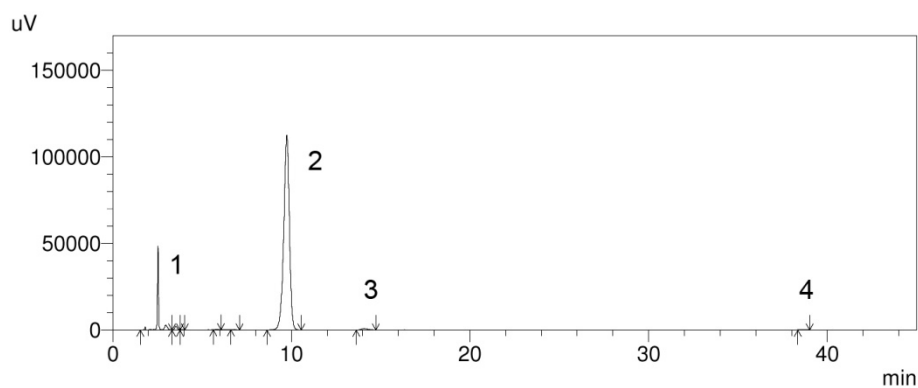
Przykładowe chromatogramy kropli bezpośrednio po sporządzeniu oraz w 30 dniu analizy przedstawiono poniżej dla wersji kropli o najbardziej złożonym składzie - konserwowanych i o zwiększonej lepkości:

- ❖ krople recepturowe: wersje 4R i IVR – w dniu sporządzenia oraz w 30 dniu przechowywania w temperaturach 4°C oraz 20°C (Ryc. 28-33),
- ❖ krople „przemysłowe”: wersje 4P0 i IVP0 oraz 4P6 i IVP6 – w dniu sporządzenia oraz w 30 dniu przechowywania w temperaturze 4°C (Ryc. 34-41).

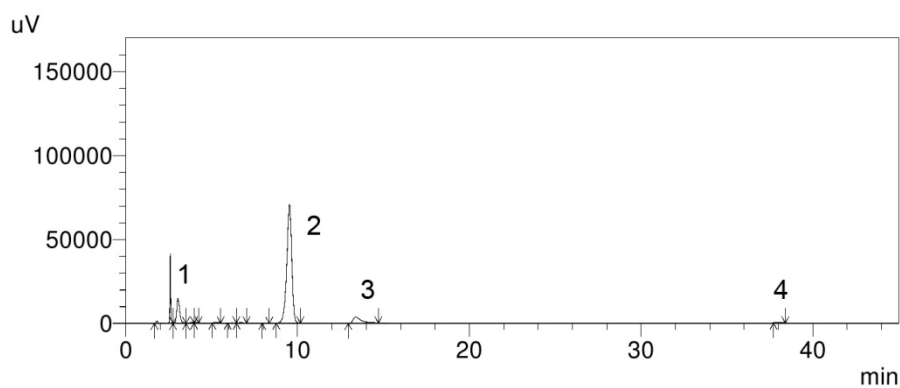
Parametry rozdziału chromatograficznego, wyznaczone podczas analizy chromatograficznej powyższych wersji przedstawiono w tabeli 39.



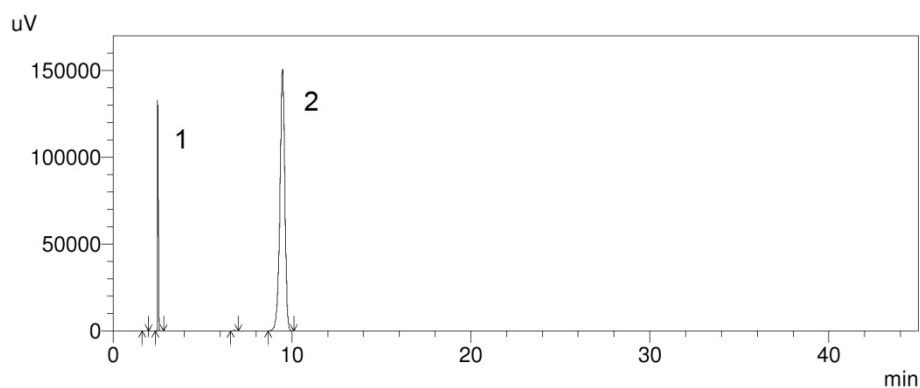
Ryc. 28. Chromatogram 1% kropli z ceftazydymem w wersji recepturowej 4R bezpośrednio po sporządzeniu (dzień 0)
1 – pik uracylu, 2 - pik ceftazydymu, 3 – pik alkoholu β -fenyloetylowego



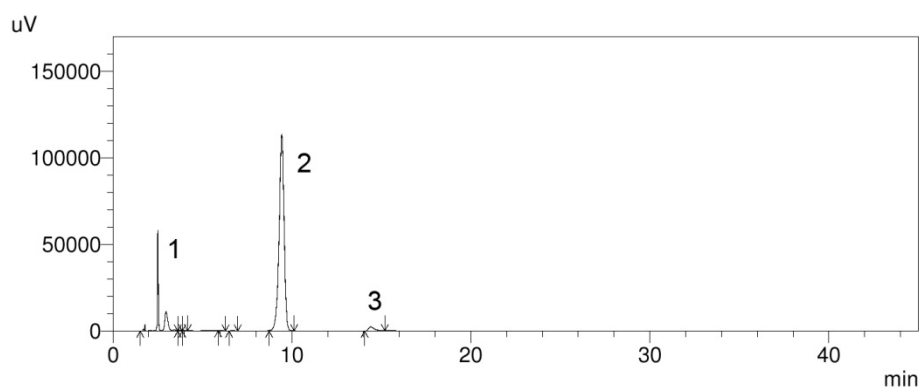
Ryc. 29. Chromatogram 1% kropli z ceftazydymem w wersji recepturowej 4R, przechowywanych w temperaturze 4°C (dzień 30)
1 – pik uracylu, 2 - pik ceftazydymu, 3 – pik pirydyny, 4 – pik alkoholu β -fenyloetylowego



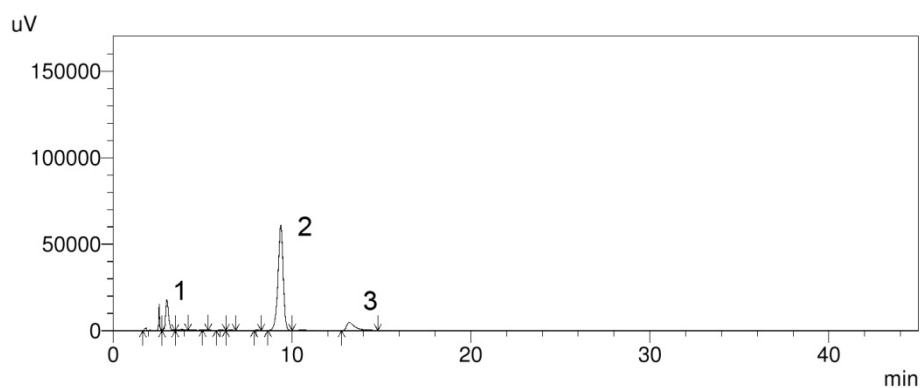
Ryc. 30. Chromatogram 1% kropli z ceftazydymem w wersji recepturowej 4R, przechowywanych w temperaturze 20°C (dzień 30)
1 – pik uracylu, 2 - pik ceftazydymu, 3 – pik pirydyny, 4 – pik alkoholu β -fenyloetylowego



Ryc. 31. Chromatogram 5% kropli z ceftazydymem w wersji recepturowej IVR bezpośrednio po sporządzeniu (dzień 0)
1 – pik uracylu, 2 - pik ceftazydymu

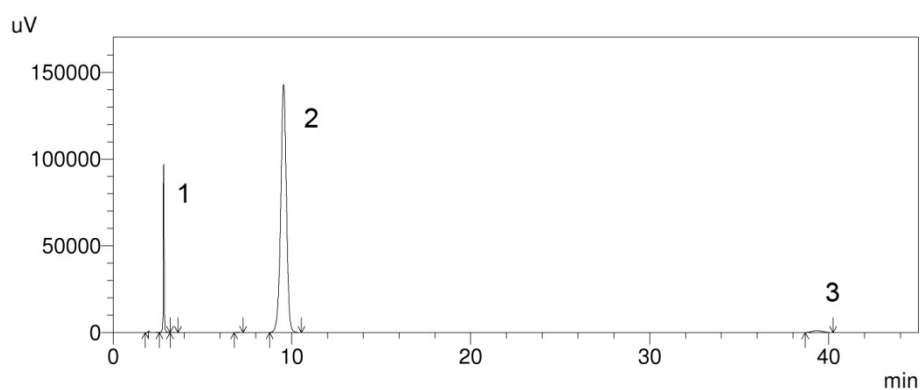


Ryc. 32. Chromatogram 5% kropli z ceftazydymem w wersji recepturowej IVR, przechowywanych w temperaturze 4°C (dzień 30)
1 – pik uracylu, 2 - pik ceftazydymu, 3 – pik pirydyny

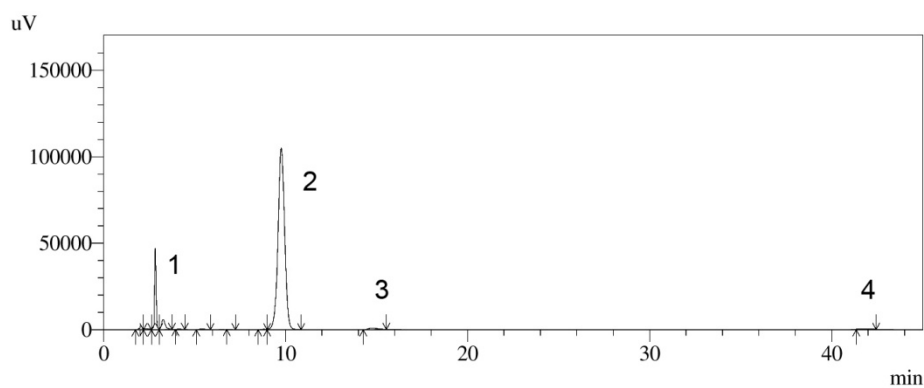


Ryc. 33. Chromatogram 5% kropli z ceftazydymem w wersji recepturowej IVR, przechowywanych w temperaturze 20°C (dzień 30)
1 – pik uracylu, 2 - pik ceftazydymu, 3 – pik pirydyny

4 P0

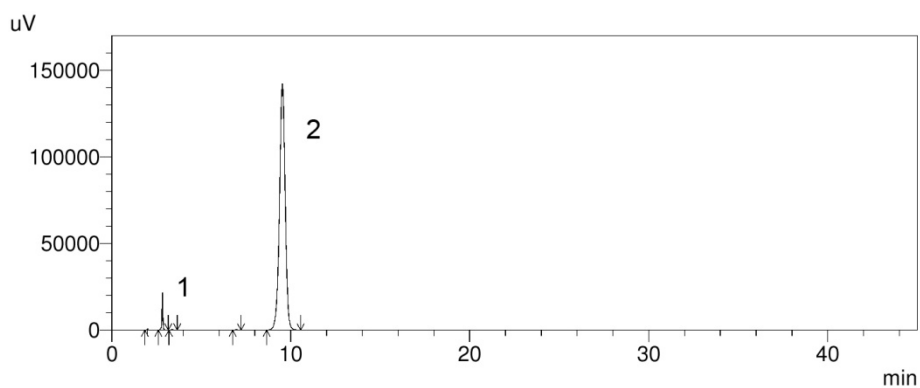


Ryc. 34. Chromatogram 1% kropli z ceftazydymem w wersji „przemysłowej” 4P0, bezpośrednio po sporządzeniu (dzień 0)
1 – pik uracylu, 2 - pik ceftazydymu, 3 – pik alkoholu β -fenyloetylowego

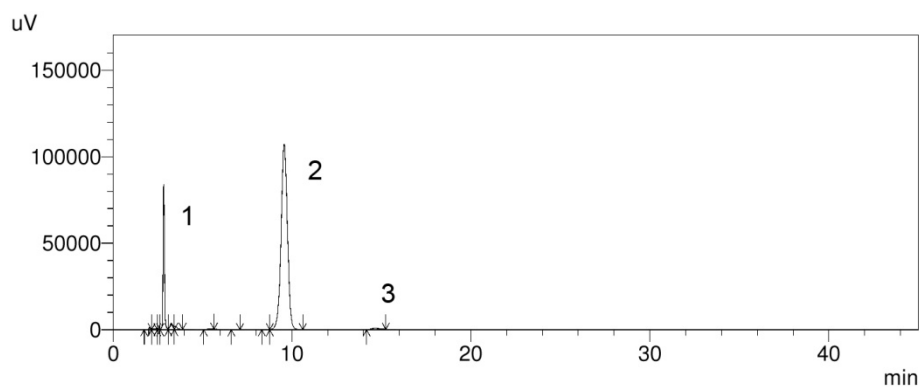


Ryc. 35. Chromatogram 1% kropli z ceftazydymem w wersji „przemysłowej” 4P0, przechowywanych w temperaturze 4°C (dzień 30)
1 – pik uracylu, 2 - pik ceftazydymu, 3 – pik pirydyny, 4 – pik alkoholu β -fenyloetylowego

IV P0

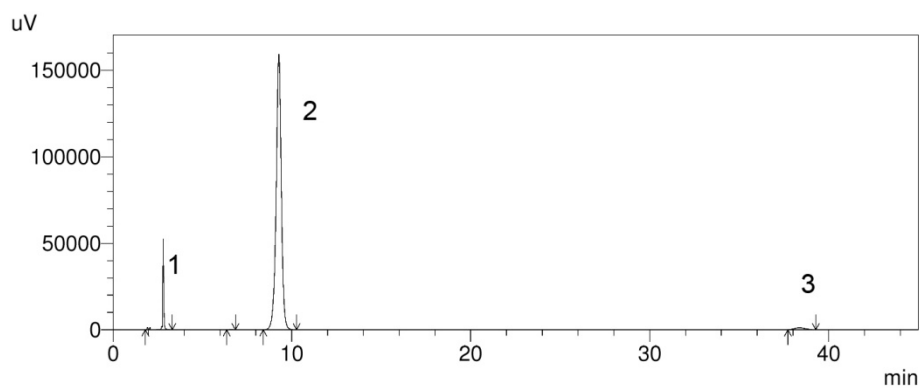


Ryc. 36. Chromatogram 5% kropli z ceftazydymem w wersji „przemysłowej” IVP0, bezpośrednio po sporządzeniu (dzień 0)
1 – pik uracylu, 2 - pik ceftazydymu

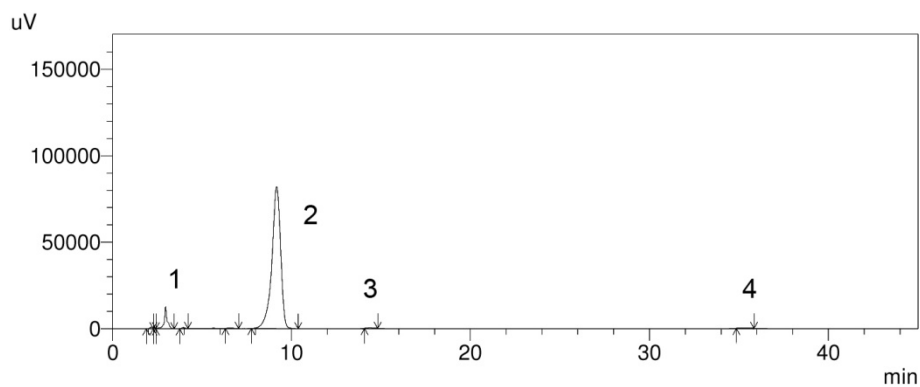


Ryc. 37. Chromatogram 5% kropli z ceftazydymem w wersji „przemysłowej” IVP0, przechowywanych w temperaturze 4°C (dzień 30)
1 – pik uracylu, 2 - pik ceftazydymu, 3 – pik pirydyny

4 P6

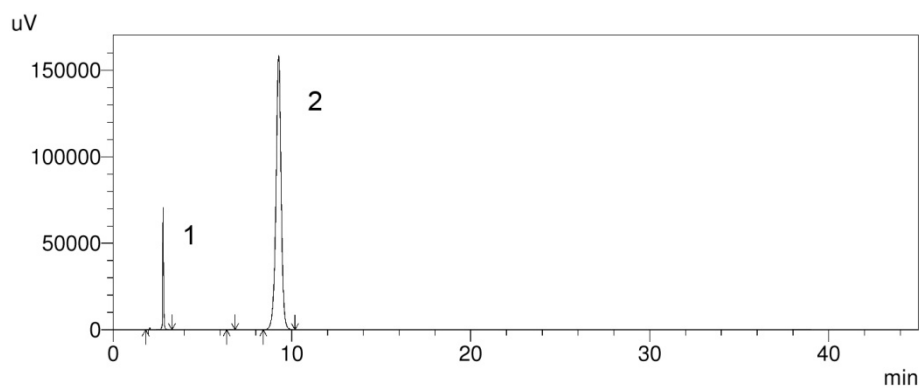


Ryc. 38. Chromatogram 1% kropli z ceftazydymem w wersji „przemysłowej” 4P6, bezpośrednio po sporządzeniu (dzień 0)
1 – pik uracylu, 2 - pik ceftazydymu, 3 – pik alkoholu β -fenyloetylowego

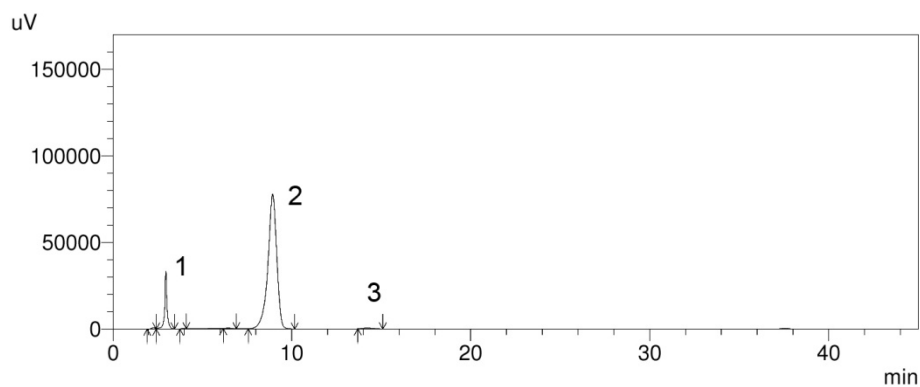


Ryc. 39. Chromatogram 1% kropli z ceftazydymem w wersji „przemysłowej” 4P6, przechowywanych w temperaturze 4°C (dzień 30)
1 – pik uracylu, 2 - pik ceftazydymu, 3 – pik pirydyny, 4 – pik alkoholu β -fenyloetylowego

IV P6



Ryc. 40. Chromatogram 5% kropli z ceftazydymem w wersji „przemysłowej” IVP6, bezpośrednio po sporządzeniu (dzień 0)
1 – pik uracylu, 2 - pik ceftazydymu



Ryc. 41. Chromatogram 5% kropli z ceftazydymem w wersji „przemysłowej” IVP6, przechowywanych w temperaturze 4°C (dzień 30)
1 – pik uracylu, 2 - pik ceftazydymu, 3 – pik pirydyny

Tabela 39. Parametry rozdziału chromatograficznego 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych i „przemysłowych” (wersja 4 i IV) bezpośrednio po sporządzeniu oraz w 30 dniu przechowywania kropli

Wersja kropli/dzień/temp.	Czas retencji t_R [min]	Współczynnik retencji k	Rozdzielczość R_s	Półki teoretyczne na metr N /metr	Współczynnik ogonowania TF	Wysokość piksu	Pole powierzchni piksu
4R/dz.0	9,454	2,772	6,458	22631,857	0,920	153827	2949372
4R/dz.30/4°C	9,741	2,844	6,205	18392,634	0,918	112487	2474165
4R/dz.30/20°C	9,526	2,682	2,670	20752,045	0,899	70617	1432210
IVR/dz.0	9,473	2,775	6,333	22753,965	0,917	150762	2892679
IVR/dz.30/4°C	9,431	2,757	1,378	22,146,857	0,912	113424	2202286
IVR/dz.30/20°C	9,376	2,629	2,949	20238,255	0,92	60810	1225096
4P0/dz.0	9,541	2,366	5,290	17561,649	0,974	143025	3159633
4P0/dz.30/4°C	9,761	2,439	1,197	13788,104	1,008	104775	2657635
IVP0/dz.0	9,531	2,371	5,314	17283,934	0,975	142328	3166065
IVP0/dz.30/4°C	9,565	2,379	1,290	14100,411	1,002	107223	2638103
4P6/dz.0	9,273	2,305	6,168	20802,353	0,970	159016	2189230
4P6/dz.30/4°C	9,169	2,100	3,634	7201,755	0,836	81995	2792941
IVP6/dz.0	9,262	2,308	6,251	20787,139	0,971	158299	3170655
IVP6/dz.30/4°C	8,928	2,021	3,329	6615,778	0,863	77797	2665412

11.6.4. Zawartość ceftazydymu w badanym materiale

Zawartość ceftazydymu w roztworach wodnych i kroplach do oczu obliczana była ze wzorów otrzymanych z przekształcenia równań regresji krzywych kalibracyjnych ceftazydymu:

- ❖ dla 1% wersji roztworów wodnych i kropli z ceftazydymem:

$$x = \frac{y \cdot 100}{a \cdot 1000}$$

- ❖ dla 5% wersji roztworów wodnych i kropli z ceftazydymem:

$$x = \frac{y \cdot 500}{a \cdot 1000}$$

gdzie:

x – stężenie ceftazydymu [mg/ml] w badanych roztworach i kroplach

y – uśrednione pole powierzchni pików ceftazydymu

a – współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej

100 lub **500** – współczynnik rozcieńczenia dla roztworów i kropli 1% lub 5%

1000 – przeliczenie jednostek: z [μg/ml] na [mg/ml]

W celu obliczenia zawartości ceftazydymu w roztworach wodnych i kroplach do oczu korzystano z jednej z trzech krzywych kalibracyjnych ceftazydymu. Każda z krzywych sporządzana była przed rozpoczęciem kolejnego etapu badań i na jej podstawie obliczano zawartość ceftazydymu w następujących wersjach:

Krzywa kalibracyjna	Analizowane wersje roztworów i kropli do oczu
A	Roztwory wodne i krople w wersjach recepturowych o niemodyfikowanej lepkości; wersje: 0,1%, 1R, 2R, 0,5%, IR, IIR,
B	Roztwory wodne i krople w wersjach recepturowych o modyfikowanej lepkości; wersje: 3R, 4R, IIIR, IVR
C	Krople w wersjach „przemysłowych” (P0 oraz P6)

Analizę HPLC prowadzono w odstępach trzydniowych, rozpoczynając od oznaczenia roztworów lub kropli bezpośrednio po sporządzeniu (dzień 0). Dla każdej serii danej wersji wykonano po 3 nastrzyki na kolumnę, uzyskując w sumie po 6 wyników dla każdej wersji roztworów wodnych lub kropli. Wyniki oznaczeń: pola powierzchni pików, zawartości ceftazydymu w kroplach [mg/ml] oraz zawartości ceftazydymu w kroplach w odniesieniu do zawartości początkowych [%] podano jako wyniki uśrednione dla n=6.

W tabelach 40 – 49 oraz na rycinach 42 - 45 przedstawiono wyniki oznaczeń roztworów wodnych oraz kropli w wersjach recepturowych.

W tabelach 50 - 53 oraz na rycinach 46 i 48 przedstawiono wyniki analiz kropli w wersjach „przemysłowych”, wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników.

W tabelach 54 - 57 oraz na rycinach 47 i 49 przedstawiono wyniki analiz kropli w wersjach „przemysłowych”, wykonanych z użyciem rozpuszczalników poddanych uprzednio procesowi przyspieszonego starzenia przez okres 6 miesięcy w temperaturze $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, przy wilgotności $75\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$.

Tabela 40. Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% roztworach wodnych, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C

1% roztwory wodne ceftazydymu (wersja 0 ₁ %)							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]	Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]
0	3182432 ± 1358	10,110 ± 0,004	100,00 ± 0,00	0	3182432 ± 1358	10,110 ± 0,004	100,00 ± 0,00
3	3173184 ± 11015	10,080 ± 0,035	99,71 ± 0,35	3	2999813 ± 17674	9,530 ± 0,056	94,26 ± 0,56
6	3127755 ± 13379	9,936 ± 0,043	98,28 ± 0,42	6	2785490 ± 7794	8,849 ± 0,025	87,53 ± 0,24
9	3073479 ± 14330	9,764 ± 0,046	96,58 ± 0,45	9	2574677 ± 9592	8,175 ± 0,029	80,87 ± 0,28
12	3055496 ± 15780	9,707 ± 0,050	96,01 ± 0,50	12	2444094 ± 8930	7,764 ± 0,028	76,80 ± 0,28
15	3023439 ± 5067	9,605 ± 0,016	95,00 ± 0,16	15	2275179 ± 12422	7,228 ± 0,039	71,49 ± 0,39
18	2989888 ± 12087	9,498 ± 0,038	93,95 ± 0,38	18	2117799 ± 6168	6,728 ± 0,020	66,55 ± 0,19
21	2959754 ± 21758	9,402 ± 0,069	93,00 ± 0,68	21	1974346 ± 9306	6,272 ± 0,030	62,04 ± 0,29
24	2928468 ± 16393	9,303 ± 0,052	92,02 ± 0,52	24	1846677 ± 2883	5,866 ± 0,009	58,03 ± 0,09
27	2917309 ± 12784	9,268 ± 0,041	91,67 ± 0,40	27	1751804 ± 17801	5,565 ± 0,057	55,05 ± 0,56
30	2852372 ± 7387	9,061 ± 0,023	89,63 ± 0,23	30	1610160 ± 14027	5,115 ± 0,045	50,60 ± 0,44

Tabela 41. Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu z ceftazydymem w wersji 1R, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C

1% krople do oczu z ceftazydymem (wersja 1R)							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]	Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]
0	3233134 ± 875	10,271 ± 0,003	100,00 ± 0,00	0	3233134 ± 875	10,271 ± 0,003	100,00 ± 0,00
3	3221991 ± 9455	10,235 ± 0,030	99,66 ± 0,29	3	3041506 ± 6458	9,662 ± 0,021	94,07 ± 0,20
6	3177563 ± 5331	10,094 ± 0,017	98,28 ± 0,16	6	2804268 ± 5401	8,908 ± 0,017	86,74 ± 0,17
9	3133381 ± 6512	9,954 ± 0,021	96,91 ± 0,20	9	2592054 ± 9799	8,234 ± 0,031	80,17 ± 0,30
12	3105739 ± 18020	9,866 ± 0,057	96,06 ± 0,56	12	2447509 ± 10560	7,775 ± 0,034	75,70 ± 0,33
15	3075433 ± 12852	9,770 ± 0,041	95,12 ± 0,40	15	2260273 ± 7651	7,180 ± 0,024	69,91 ± 0,24
18	3025143 ± 8955	9,610 ± 0,028	93,57 ± 0,28	18	2101641 ± 11588	6,676 ± 0,037	65,00 ± 0,36
21	2994617 ± 10423	9,513 ± 0,033	92,62 ± 0,32	21	1946683 ± 15229	6,184 ± 0,048	60,21 ± 0,47
24	2972052 ± 10916	9,441 ± 0,035	91,92 ± 0,34	24	1809210 ± 17157	5,747 ± 0,055	55,96 ± 0,53
27	2938651 ± 14992	9,335 ± 0,048	90,89 ± 0,46	27	1716661 ± 20003	5,453 ± 0,064	53,10 ± 0,62
30	2880126 ± 10471	9,149 ± 0,033	89,08 ± 0,32	30	1548492 ± 11963	4,919 ± 0,038	47,89 ± 0,37

Tabela 42. Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu z ceftazydymem w wersji 2R, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C

1% krople do oczu z ceftazydymem (wersja 2R)							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]	Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]
0	3160003 ± 2538	10,038 ± 0,008	100,00 ± 0,00	0	3160003 ± 2538	10,038 ± 0,008	100,00 ± 0,00
3	3122964 ± 18218	9,921 ± 0,058	98,83 ± 0,58	3	2936386 ± 11954	9,328 ± 0,038	92,92 ± 0,38
6	3095442 ± 11858	9,833 ± 0,038	97,96 ± 0,38	6	2750977 ± 17288	8,739 ± 0,055	87,06 ± 0,55
9	3049812 ± 8543	9,688 ± 0,027	96,51 ± 0,27	9	2559517 ± 6783	8,131 ± 0,022	81,00 ± 0,21
12	3011300 ± 9224	9,566 ± 0,029	95,29 ± 0,29	12	2360591 ± 22840	7,499 ± 0,073	74,70 ± 0,72
15	2992825 ± 18216	9,507 ± 0,058	94,71 ± 0,58	15	2219677 ± 18925	7,051 ± 0,060	70,24 ± 0,60
18	2959051 ± 12425	9,400 ± 0,039	93,64 ± 0,39	18	2033512 ± 28527	6,460 ± 0,091	64,35 ± 0,90
21	2929614 ± 2827	9,307 ± 0,009	92,71 ± 0,09	21	1927717 ± 22662	6,124 ± 0,072	61,00 ± 0,72
24	2880081 ± 10320	9,149 ± 0,033	91,14 ± 0,33	24	1724096 ± 11025	5,477 ± 0,035	54,56 ± 0,35
27	2810774 ± 23899	8,929 ± 0,076	88,95 ± 0,76	27	1613535 ± 7153	5,126 ± 0,023	51,06 ± 0,23
30	2804828 ± 6602	8,910 ± 0,021	88,76 ± 0,21	30	1495219 ± 4622	4,750 ± 0,015	47,32 ± 0,15

Tabela 43. Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu z ceftazydymem w wersji 3R, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C

1% krople do oczu z ceftazydymem (wersja 3R)							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]	Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]
0	2908201 ± 2923	9,884 ± 0,010	100,00 ± 0,00	0	2908201 ± 2923	9,884 ± 0,010	100,00 ± 0,00
3	2841381 ± 10436	9,657 ± 0,035	97,70 ± 0,36	3	2683289 ± 6787	9,120 ± 0,023	92,27 ± 0,23
6	2811085 ± 9427	9,554 ± 0,032	96,66 ± 0,32	6	2442835 ± 16518	8,303 ± 0,056	84,00 ± 0,57
9	2787312 ± 6541	9,474 ± 0,022	95,84 ± 0,22	9	2260273 ± 7651	7,682 ± 0,026	77,72 ± 0,26
12	2762710 ± 7992	9,390 ± 0,027	95,00 ± 0,27	12	2159840 ± 9307	7,341 ± 0,032	74,27 ± 0,32
15	2737973 ± 25643	9,306 ± 0,087	94,15 ± 0,88	15	1847061 ± 27957	6,278 ± 0,095	63,51 ± 0,96
18	2620869 ± 2923	8,908 ± 0,010	90,12 ± 0,10	18	1727871 ± 24972	5,873 ± 0,085	59,41 ± 0,86
21	2582205 ± 11250	8,776 ± 0,038	88,79 ± 0,39	21	1646181 ± 2909	5,595 ± 0,010	56,60 ± 0,10
24	2561729 ± 9413	8,707 ± 0,032	88,09 ± 0,32	24	1553227 ± 7376	5,279 ± 0,025	53,41 ± 0,25
27	2458436 ± 16168	8,356 ± 0,055	84,53 ± 0,56	27	1387881 ± 16336	4,717 ± 0,056	47,72 ± 0,56
30	2374552 ± 4879	8,071 ± 0,017	81,65 ± 0,17	30	1339736 ± 31065	4,554 ± 0,106	46,07 ± 1,07

Tabela 44. Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu z ceftazydymem w wersji 4R, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C

1% krople do oczu z ceftazydymem (wersja 4R)							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni piklu ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]	Dzień	Średnie pole powierzchni piklu ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]
0	2943429 ± 10347	10,004 ± 0,035	100,00 ± 0,00	0	2943429 ± 10347	10,004 ± 0,035	100,00 ± 0,00
3	2889298 ± 20765	9,820 ± 0,071	98,16 ± 0,71	3	2693915 ± 35301	9,156 ± 0,120	91,52 ± 1,20
6	2867414 ± 9478	9,746 ± 0,032	97,42 ± 0,32	6	2615225 ± 21843	8,889 ± 0,074	88,85 ± 0,74
9	2823428 ± 6218	9,596 ± 0,021	95,92 ± 0,21	9	2301230 ± 17711	7,821 ± 0,060	78,18 ± 0,60
12	2808510 ± 13689	9,546 ± 0,047	95,42 ± 0,47	12	2209189 ± 12859	7,509 ± 0,044	75,05 ± 0,44
15	2749416 ± 11944	9,345 ± 0,041	93,41 ± 0,41	15	2040219 ± 15147	6,934 ± 0,051	69,31 ± 0,51
18	2713673 ± 4346	9,223 ± 0,015	92,19 ± 0,15	18	1893251 ± 9413	6,435 ± 0,032	64,32 ± 0,32
21	2638012 ± 30727	8,966 ± 0,104	89,62 ± 1,04	21	1802503 ± 13495	6,126 ± 0,046	61,24 ± 0,46
24	2559047 ± 17424	8,698 ± 0,059	86,94 ± 0,59	24	1612982 ± 20014	5,482 ± 0,068	54,80 ± 0,68
27	2501429 ± 24879	8,502 ± 0,085	84,98 ± 0,85	27	1532395 ± 5930	5,208 ± 0,020	52,06 ± 0,20
30	2456459 ± 23274	8,349 ± 0,079	83,46 ± 0,79	30	1453033 ± 28735	4,939 ± 0,098	49,37 ± 0,98

Tabela 45. Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% roztworach wodnych, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C

5% roztwory wodne ceftazydymu (wersja 0 ₅ %)							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]	Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]
0	3162367 ± 20800	50,230 ± 0,330	100,00 ± 0,00	0	3162367 ± 20800	50,230 ± 0,330	100,00 ± 0,00
3	3107702 ± 24235	49,362 ± 0,385	98,27 ± 0,77	3	2802311 ± 11621	44,511 ± 0,185	88,61 ± 0,37
6	3090063 ± 25228	49,082 ± 0,401	97,71 ± 0,80	6	2540268 ± 41068	40,349 ± 0,652	80,33 ± 1,30
9	3046551 ± 13666	48,390 ± 0,217	96,34 ± 0,43	9	2332889 ± 9497	37,055 ± 0,151	73,77 ± 0,30
12	2997499 ± 22104	47,611 ± 0,351	94,79 ± 0,70	12	2095986 ± 6435	33,292 ± 0,102	66,28 ± 0,20
15	2944846 ± 6625	46,775 ± 0,105	93,12 ± 0,21	15	1883911 ± 15612	29,923 ± 0,248	59,57 ± 0,49
18	2851972 ± 16360	45,300 ± 0,260	90,18 ± 0,52	18	1682667 ± 13689	26,727 ± 0,217	53,21 ± 0,43
21	2776659 ± 12326	44,104 ± 0,196	87,80 ± 0,39	21	1513923 ± 8811	24,047 ± 0,140	47,87 ± 0,28
24	2747952 ± 11468	43,648 ± 0,182	86,90 ± 0,36	24	1422834 ± 11051	22,600 ± 0,176	44,99 ± 0,35
27	2700579 ± 10274	42,895 ± 0,163	85,40 ± 0,32	27	1269068 ± 15023	20,157 ± 0,239	40,13 ± 0,48
30	2683237 ± 15120	42,620 ± 0,240	84,85 ± 0,48	30	1163131 ± 11590	18,475 ± 0,184	36,78 ± 0,37

Tabela 46. Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu z ceftazydymem w wersji IR, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C

5% krople do oczu z ceftazydymem (wersja IR)							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]	Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]
0	3200791 ± 13883	50,840 ± 0,221	100,00 ± 0,00	0	3200791 ± 13883	50,840 ± 0,221	100,00 ± 0,00
3	3138778 ± 18491	49,855 ± 0,294	98,06 ± 0,58	3	2854343 ± 20784	45,337 ± 0,330	89,18 ± 0,65
6	3109792 ± 49177	48,738 ± 0,061	95,86 ± 0,12	6	2696426 ± 156712	40,544 ± 0,137	79,75 ± 0,27
9	3040536 ± 11468	48,295 ± 0,182	94,99 ± 0,36	9	2326726 ± 10479	36,957 ± 0,166	72,69 ± 0,33
12	2988155 ± 2502	47,463 ± 0,040	93,36 ± 0,08	12	2064019 ± 14085	32,784 ± 0,224	64,48 ± 0,44
15	2934702 ± 39762	46,614 ± 0,632	91,69 ± 1,24	15	1828930 ± 5628	29,050 ± 0,089	57,14 ± 0,18
18	2898883 ± 22434	46,045 ± 0,356	90,57 ± 0,70	18	1655865 ± 19243	26,301 ± 0,306	51,73 ± 0,60
21	2800734 ± 14772	44,486 ± 0,235	87,50 ± 0,46	21	1455749 ± 22820	23,123 ± 0,362	45,48 ± 0,71
24	2778463 ± 9624	44,132 ± 0,153	86,81 ± 0,30	24	1370616 ± 12698	21,770 ± 0,202	42,82 ± 0,40
27	2750401 ± 5941	43,686 ± 0,094	85,93 ± 0,19	27	1221437 ± 5933	19,401 ± 0,094	38,16 ± 0,19
30	2726422 ± 9592	43,306 ± 0,152	85,18 ± 0,30	30	1140131 ± 9599	18,109 ± 0,152	35,62 ± 0,30

Tabela 47. Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu z ceftazydymem w wersji IIR, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C

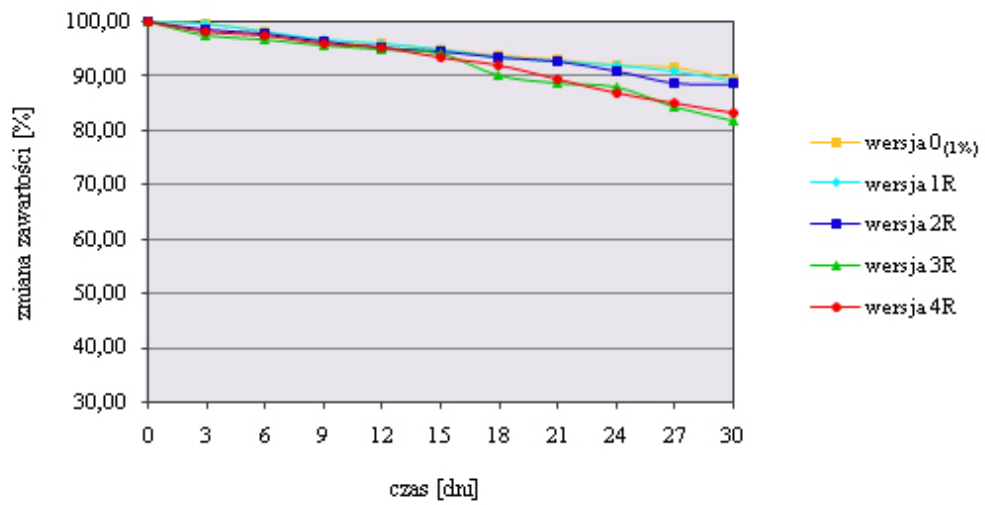
5% krople do oczu z ceftazydymem (wersja IIR)							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]	Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]
0	3146799 ± 24335	49,983 ± 0,387	100,00 ± 0,00	0	3146799 ± 24335	49,983 ± 0,387	100,00 ± 0,00
3	3117464 ± 7639	49,517 ± 0,121	99,07 ± 0,24	3	2896761 ± 16108	46,011 ± 0,256	92,05 ± 0,51
6	3092440 ± 31842	48,847 ± 0,330	97,73 ± 0,66	6	2611572 ± 17091	41,481 ± 0,271	82,99 ± 0,54
9	3031673 ± 8463	48,154 ± 0,134	96,34 ± 0,27	9	2364748 ± 19966	37,561 ± 0,317	75,15 ± 0,63
12	2990033 ± 17619	47,493 ± 0,280	95,02 ± 0,56	12	2112117 ± 15917	33,548 ± 0,253	67,12 ± 0,51
15	2935849 ± 5130	46,632 ± 0,081	93,30 ± 0,16	15	1908715 ± 6462	30,317 ± 0,103	60,66 ± 0,21
18	2872757 ± 16080	45,630 ± 0,255	91,29 ± 0,51	18	1736526 ± 23652	27,582 ± 0,376	55,18 ± 0,75
21	2837889 ± 12624	44,797 ± 0,469	89,63 ± 0,94	21	1551525 ± 14241	24,644 ± 0,226	49,30 ± 0,45
24	2793631 ± 11230	44,164 ± 0,314	88,36 ± 0,63	24	1404204 ± 29629	22,304 ± 0,471	44,62 ± 0,94
27	2742721 ± 17090	43,565 ± 0,271	87,16 ± 0,54	27	1256133 ± 4871	19,952 ± 0,077	39,93 ± 0,15
30	2663989 ± 14385	42,314 ± 0,228	84,66 ± 0,46	30	1206710 ± 6878	19,167 ± 0,109	38,25 ± 0,22

Tabela 48. Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu z ceftazydymem w wersji IIR, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C

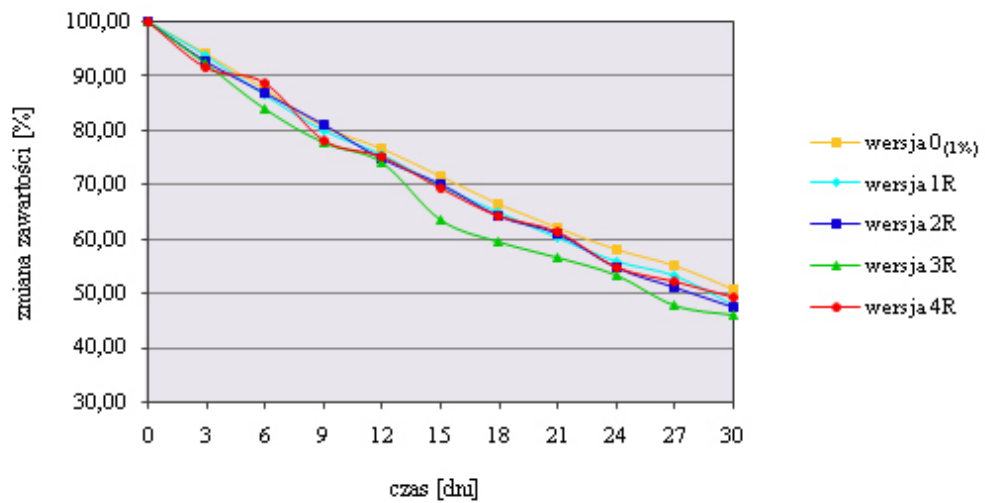
5% krople do oczu z ceftazydymem (wersja IIR)							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]	Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]
0	2859154 ± 710	48,589 ± 0,012	100,00 ± 0,00	0	2859154 ± 710	48,589 ± 0,012	100,00 ± 0,00
3	2796008 ± 14701	47,516 ± 0,250	97,79 ± 0,51	3	2540625 ± 15161	43,176 ± 0,258	88,86 ± 0,53
6	2759194 ± 11041	46,890 ± 0,188	96,50 ± 0,39	6	2444538 ± 7578	41,543 ± 0,129	85,50 ± 0,27
9	2752675 ± 11581	46,779 ± 0,197	96,28 ± 0,41	9	2099025 ± 10568	35,671 ± 0,180	73,41 ± 0,37
12	2670709 ± 7621	45,386 ± 0,130	93,41 ± 0,27	12	1924085 ± 12803	32,698 ± 0,218	67,30 ± 0,45
15	2604637 ± 6298	44,263 ± 0,107	91,10 ± 0,22	15	1610160 ± 14027	27,363 ± 0,238	56,32 ± 0,49
18	2510781 ± 12122	42,668 ± 0,206	87,82 ± 0,42	18	1472207 ± 16211	25,019 ± 0,275	51,49 ± 0,57
21	2447705 ± 8967	41,597 ± 0,152	85,61 ± 0,31	21	1393929 ± 24456	23,689 ± 0,416	48,75 ± 0,86
24	2406904 ± 18002	40,903 ± 0,306	84,18 ± 0,63	24	1266332 ± 10811	21,520 ± 0,184	44,29 ± 0,38
27	2326726 ± 10479	39,541 ± 0,178	81,38 ± 0,37	27	1205279 ± 16849	20,483 ± 0,286	42,16 ± 0,59
30	2275179 ± 12422	38,665 ± 0,211	79,58 ± 0,43	30	1138330 ± 8384	19,345 ± 0,142	39,81 ± 0,29

Tabela 49. Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu z ceftazydymem w wersji IVR, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C

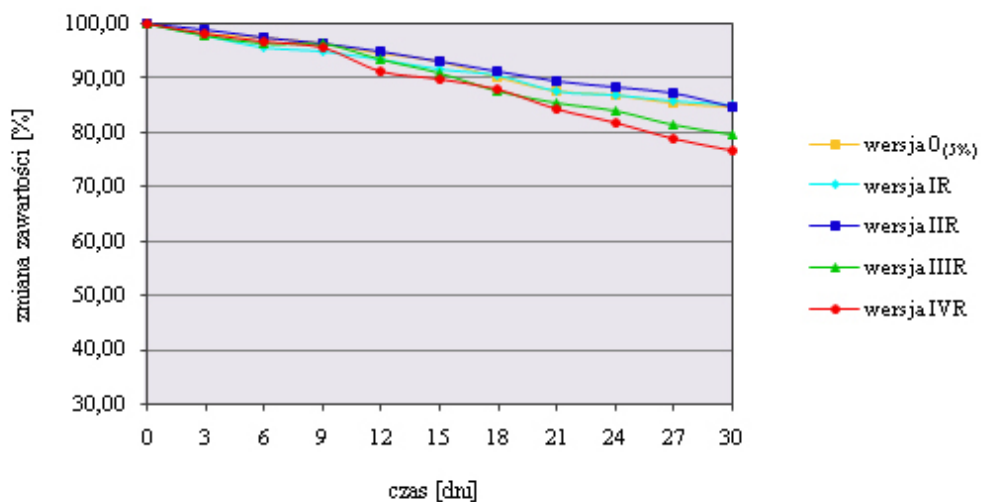
5% krople do oczu z ceftazydymem (wersja IVR)							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]	Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]
0	2893391 ± 3197	49,171 ± 0,054	100,00 ± 0,00	0	2893391 ± 3197	49,171 ± 0,054	100,00 ± 0,00
3	2841120 ± 7488	48,282 ± 0,127	98,19 ± 0,26	3	2602592 ± 12196	44,229 ± 0,207	89,95 ± 0,42
6	2805141 ± 17148	47,671 ± 0,291	96,95 ± 0,59	6	2476285 ± 25272	42,082 ± 0,429	85,58 ± 0,87
9	2765578 ± 9458	46,999 ± 0,161	95,58 ± 0,33	9	2216616 ± 3258	37,669 ± 0,055	76,61 ± 0,11
12	2640199 ± 34923	44,868 ± 0,593	91,25 ± 1,21	12	1988434 ± 29369	33,792 ± 0,499	68,72 ± 1,02
15	2601039 ± 19807	44,202 ± 0,337	89,90 ± 0,68	15	1738649 ± 4583	29,547 ± 0,078	60,09 ± 0,16
18	2542298 ± 15548	43,204 ± 0,264	87,87 ± 0,54	18	1504996 ± 9918	25,576 ± 0,169	52,01 ± 0,34
21	2439741 ± 21923	41,461 ± 0,373	84,32 ± 0,76	21	1387335 ± 25132	23,577 ± 0,427	47,95 ± 0,87
24	2370814 ± 2400	40,290 ± 0,041	81,94 ± 0,08	24	1261869 ± 20539	21,444 ± 0,349	43,61 ± 0,71
27	2287942 ± 3785	38,882 ± 0,064	79,07 ± 0,13	27	1246574 ± 6647	21,184 ± 0,113	43,08 ± 0,23
30	2221335 ± 9895	37,750 ± 0,168	77,76 ± 0,34	30	1222641 ± 14193	20,778 ± 0,241	42,26 ± 0,49



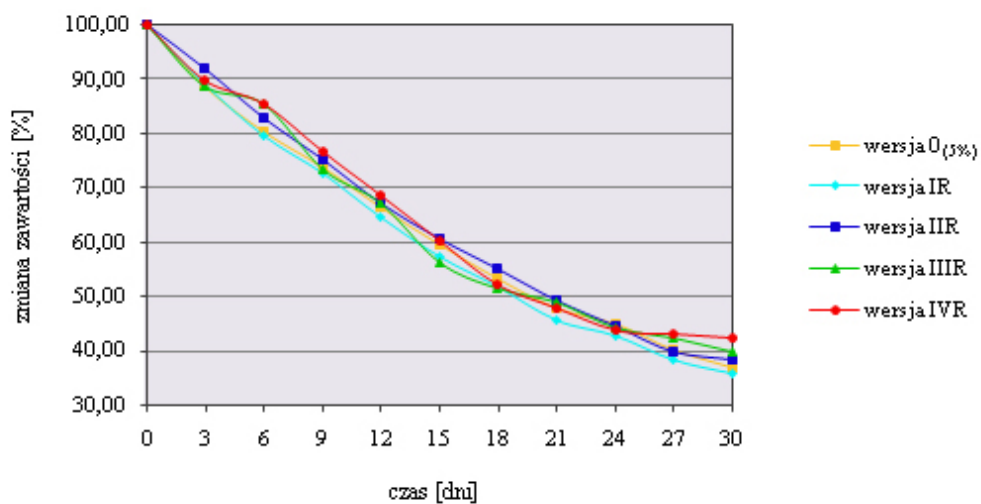
Ryc. 42. Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% roztworach wodnych i kroplach w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4°C



Ryc. 43. Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% roztworach wodnych i kroplach w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 20°C



Ryc. 44. Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% roztworach wodnych i kroplach w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4°C



Ryc. 45. Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% roztworach wodnych i kroplach w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 20°C

Tabela 50. Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych”: 1P0 oraz 2P0, przechowywanych w temperaturze 4°C, wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników

1% krople do oczu z ceftazydymem (wersje 1P0 i 2P0)							
Wersja 1P0				Wersja 2P0			
Dzień	Średnie pole powierzchni piklu ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]	Dzień	Średnie pole powierzchni piklu ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]
0	3139138 ± 9551	10,400 ± 0,032	100,00 ± 0,00	0	3131359 ± 3433	10,374 ± 0,011	100,00 ± 0,00
3	3090674 ± 8073	10,239 ± 0,027	98,46 ± 0,26	3	3084220 ± 5470	10,218 ± 0,018	98,49 ± 0,17
6	3033464 ± 2827	10,050 ± 0,009	96,63 ± 0,09	6	3040852 ± 2609	10,074 ± 0,009	97,11 ± 0,08
9	2978051 ± 6577	9,866 ± 0,022	94,87 ± 0,21	9	2964940 ± 3591	9,823 ± 0,012	94,69 ± 0,11
12	2943364 ± 7339	9,751 ± 0,024	93,76 ± 0,23	12	2912663 ± 3154	9,649 ± 0,010	93,02 ± 0,10
15	2936092 ± 4390	9,727 ± 0,015	93,53 ± 0,14	15	2912460 ± 9097	9,649 ± 0,030	93,01 ± 0,29
18	2927285 ± 2443	9,698 ± 0,008	93,25 ± 0,08	18	2920588 ± 5490	9,676 ± 0,018	93,27 ± 0,18
21	2922823 ± 7138	9,683 ± 0,024	93,11 ± 0,23	21	2891659 ± 7272	9,580 ± 0,024	92,35 ± 0,23
24	2847406 ± 6236	9,433 ± 0,021	90,71 ± 0,20	24	2859716 ± 8240	9,474 ± 0,027	91,33 ± 0,26
27	2799913 ± 7957	9,276 ± 0,026	89,19 ± 0,25	27	2811029 ± 5434	9,313 ± 0,018	89,77 ± 0,17
30	2767704 ± 8630	9,169 ± 0,029	88,17 ± 0,27	30	2755595 ± 11340	9,129 ± 0,038	88,00 ± 0,36

Tabela 51. Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych”: 3P0 oraz 4P0, przechowywanych w temperaturze 4°C, wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników

1% krople do oczu z ceftazydymem (wersje 3P0 i 4P0)							
Wersja 3P0				Wersja 4P0			
Dzień	Średnie pole powierzchni piklu ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]	Dzień	Średnie pole powierzchni piklu ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]
0	3116201 ± 8198	10,324 ± 0,027	100,00 ± 0,00	0	3154766 ± 3832	10,451 ± 0,013	100,00 ± 0,00
3	3068135 ± 6613	10,164 ± 0,022	98,46 ± 0,21	3	3125046 ± 4530	10,353 ± 0,015	99,06 ± 0,14
6	3003762 ± 3113	9,951 ± 0,010	96,39 ± 0,10	6	3061372 ± 5752	10,142 ± 0,019	97,04 ± 0,18
9	2935392 ± 9663	9,725 ± 0,032	94,20 ± 0,31	9	2970548 ± 3713	9,841 ± 0,012	94,16 ± 0,12
12	2891088 ± 9030	9,578 ± 0,030	92,78 ± 0,29	12	2909064 ± 39728	9,637 ± 0,132	92,21 ± 1,26
15	2879418 ± 5994	9,539 ± 0,020	92,40 ± 0,19	15	2875705 ± 5633	9,527 ± 0,019	91,15 ± 0,18
18	2875230 ± 14614	9,525 ± 0,048	92,27 ± 0,47	18	2890923 ± 7354	9,577 ± 0,024	91,64 ± 0,23
21	2815215 ± 5430	9,327 ± 0,018	90,34 ± 0,17	21	2856731 ± 7433	9,464 ± 0,025	90,55 ± 0,24
24	2763994 ± 7226	9,157 ± 0,024	88,70 ± 0,23	24	2820373 ± 8512	9,344 ± 0,028	89,40 ± 0,27
27	2741569 ± 9471	9,083 ± 0,031	87,98 ± 0,30	27	2764678 ± 5164	9,159 ± 0,017	87,63 ± 0,16
30	2630825 ± 10283	8,716 ± 0,034	84,42 ± 0,33	30	2652008 ± 4931	8,786 ± 0,016	84,06 ± 0,16

Tabela 52. Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych”: IP0 oraz IIP0, przechowywanych w temperaturze 4°C, wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników

5% krople do oczu z ceftazydymem (wersje IP0 i IIP0)							
Wersja IP0				Wersja IIP0			
Dzień	Średnie pole powierzchni piklu ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]	Dzień	Średnie pole powierzchni piklu ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]
0	3183704 ± 9394	52,736 ± 0,156	100,00 ± 0,00	0	3185144 ± 5496	52,760 ± 0,091	100,00 ± 0,00
3	3109343 ± 13893	51,505 ± 0,230	97,66 ± 0,44	3	3098546 ± 12106	51,326 ± 0,201	97,28 ± 0,38
6	3035180 ± 4229	50,276 ± 0,070	95,33 ± 0,13	6	3045576 ± 5757	50,448 ± 0,095	95,62 ± 0,18
9	2970064 ± 5220	49,198 ± 0,086	93,29 ± 0,16	9	2973613 ± 7853	49,256 ± 0,130	93,36 ± 0,25
12	2912141 ± 6458	48,238 ± 0,107	91,47 ± 0,20	12	2883821 ± 16937	47,769 ± 0,281	90,54 ± 0,53
15	2906047 ± 3546	48,137 ± 0,059	91,28 ± 0,11	15	2874454 ± 14384	47,614 ± 0,238	90,25 ± 0,45
18	2875147 ± 3437	47,625 ± 0,057	90,31 ± 0,11	18	2869948 ± 11186	47,539 ± 0,185	90,10 ± 0,35
21	2857615 ± 23208	47,335 ± 0,384	89,76 ± 0,73	21	2833709 ± 11761	46,939 ± 0,195	88,97 ± 0,37
24	2817016 ± 9923	46,662 ± 0,164	88,48 ± 0,31	24	2801706 ± 10805	46,409 ± 0,179	87,96 ± 0,34
27	2780328 ± 14406	46,055 ± 0,239	87,33 ± 0,45	27	2735887 ± 9895	45,319 ± 0,164	85,90 ± 0,31
30	2670099 ± 54644	44,229 ± 0,905	83,87 ± 1,72	30	2667926 ± 7586	44,193 ± 0,126	83,76 ± 0,24

Tabela 53. Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych”: IIP0 oraz IVP0, przechowywanych w temperaturze 4°C, wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników

5% krople do oczu z ceftazydymem (wersje IIP0 i IVP0)							
Wersja IIP0				Wersja IVP0			
Dzień	Średnie pole powierzchni piklu ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]	Dzień	Średnie pole powierzchni piklu ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]
0	3173265 ± 10993	52,563 ± 0,182	100,00 ± 0,00	0	3155221 ± 8419	52,265 ± 0,139	100,00 ± 0,00
3	3094499 ± 8459	51,259 ± 0,140	97,52 ± 0,27	3	3095013 ± 10382	51,267 ± 0,172	98,09 ± 0,33
6	3015433 ± 2696	49,949 ± 0,045	95,03 ± 0,08	6	3032821 ± 4946	50,237 ± 0,082	96,12 ± 0,16
9	2934984 ± 4070	49,162 ± 0,161	93,53 ± 0,31	9	2934696 ± 8809	48,612 ± 0,146	93,01 ± 0,28
12	2967909 ± 9734	48,616 ± 0,067	92,49 ± 0,13	12	2898040 ± 15498	48,004 ± 0,257	91,85 ± 0,49
15	2893078 ± 13587	47,922 ± 0,225	91,17 ± 0,43	15	2860848 ± 7323	47,388 ± 0,121	90,67 ± 0,23
18	2861090 ± 28270	47,392 ± 0,468	90,16 ± 0,89	18	2827145 ± 25869	46,830 ± 0,429	89,60 ± 0,82
21	2811798 ± 43600	46,576 ± 0,722	88,61 ± 1,37	21	2782371 ± 24317	46,088 ± 0,403	88,18 ± 0,77
24	2761829 ± 8197	45,748 ± 0,136	87,03 ± 0,26	24	2746709 ± 14560	45,498 ± 0,241	87,05 ± 0,46
27	2726475 ± 14819	45,163 ± 0,245	85,92 ± 0,47	27	2701575 ± 12481	44,750 ± 0,207	85,62 ± 0,40
30	2665488 ± 5046	44,152 ± 0,084	84,00 ± 0,16	30	2617303 ± 38509	43,354 ± 0,638	82,95 ± 1,22

Tabela 54. Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych”: 1P6 oraz 2P6, przechowywanych w temperaturze 4°C, sporządzonych z użyciem rozpuszczalników, poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia

1% krople do oczu z ceftazydymem (wersje 1P6 i 2P6)							
Wersja 1P6				Wersja 2P6			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]	Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]
0	3157290 ± 1012	10,460 ± 0,003	100,00 ± 0,00	0	3171503 ± 1446	10,507 ± 0,005	100,00 ± 0,00
3	3105789 ± 3290	10,289 ± 0,011	98,37 ± 0,10	3	3131490 ± 11446	10,374 ± 0,038	98,74 ± 0,36
6	3044835 ± 5667	10,087 ± 0,019	96,44 ± 0,18	6	3068542 ± 2568	10,166 ± 0,009	96,75 ± 0,08
9	3001883 ± 4243	9,945 ± 0,014	95,08 ± 0,13	9	3031022 ± 10000	10,041 ± 0,033	95,57 ± 0,32
12	2972530 ± 25595	9,848 ± 0,085	94,15 ± 0,81	12	2965882 ± 6105	9,826 ± 0,020	93,52 ± 0,19
15	2941451 ± 23719	9,745 ± 0,079	93,64 ± 0,17	15	2981112 ± 8538	9,876 ± 0,028	94,00 ± 0,27
18	2889371 ± 25239	9,572 ± 0,084	93,16 ± 0,75	18	2926865 ± 10458	9,696 ± 0,035	92,29 ± 0,33
21	2892117 ± 3575	9,581 ± 0,012	91,60 ± 0,11	21	2914654 ± 6774	9,656 ± 0,022	91,90 ± 0,21
24	2853871 ± 20732	9,455 ± 0,069	91,51 ± 0,80	24	2875842 ± 3311	9,527 ± 0,011	90,68 ± 0,10
27	2830641 ± 13916	9,378 ± 0,046	89,65 ± 0,44	27	2823563 ± 5178	9,354 ± 0,017	89,03 ± 0,16
30	2728798 ± 5071	9,040 ± 0,017	86,43 ± 0,16	30	2756426 ± 2496	9,132 ± 0,008	86,91 ± 0,08

Tabela 55. Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych”: 3P6 oraz 4P6, przechowywanych w temperaturze 4°C, sporządzonych z użyciem rozpuszczalników, poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia

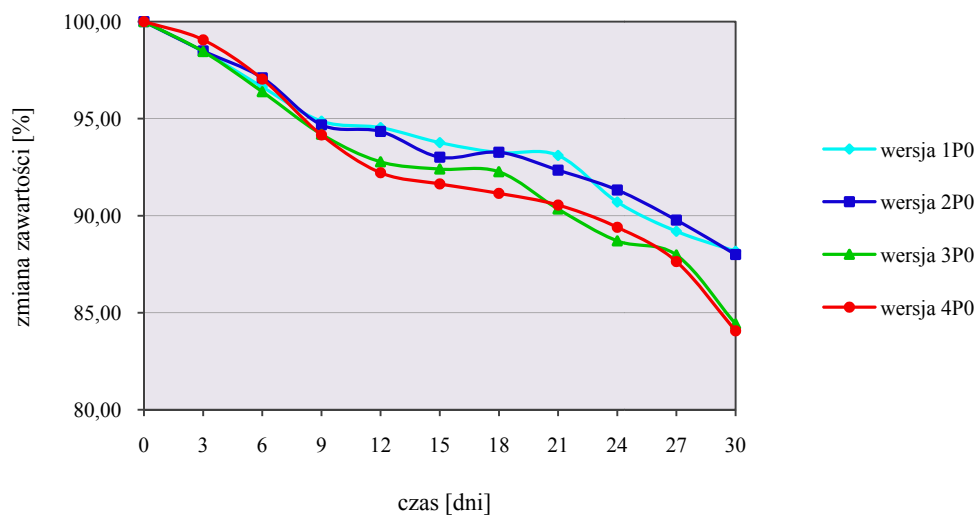
1% krople do oczu z ceftazydymem (wersje 3P6 i 4P6)							
Wersja 3P6				Wersja 4P6			
Dzień	Średnie pole powierzchni piklu ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]	Dzień	Średnie pole powierzchni piklu ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]
0	3219739 ± 592	10,667 ± 0,002	100,00 ± 0,00	0	3187348 ± 1733	10,559 ± 0,006	100,00 ± 0,00
3	3177688 ± 17336	10,527 ± 0,057	98,69 ± 0,54	3	3150187 ± 5419	10,436 ± 0,018	98,83 ± 0,17
6	3121449 ± 5080	10,341 ± 0,017	96,95 ± 0,16	6	3094698 ± 10603	10,252 ± 0,035	97,09 ± 0,33
9	3081286 ± 5870	10,208 ± 0,019	95,70 ± 0,18	9	3053256 ± 2301	10,115 ± 0,008	95,79 ± 0,07
12	3039467 ± 6119	10,069 ± 0,020	94,40 ± 0,19	12	2973871 ± 4359	9,852 ± 0,014	93,30 ± 0,14
15	3017040 ± 5463	9,995 ± 0,018	93,70 ± 0,17	15	2986236 ± 4121	9,893 ± 0,014	93,69 ± 0,13
18	2934882 ± 26243	9,723 ± 0,087	91,15 ± 0,82	18	2924696 ± 5481	9,689 ± 0,018	91,76 ± 0,17
21	2927867 ± 23779	9,700 ± 0,079	90,93 ± 0,74	21	2915672 ± 6623	9,659 ± 0,022	91,48 ± 0,21
24	2877873 ± 57489	9,534 ± 0,190	89,38 ± 1,79	24	2889291 ± 11029	9,572 ± 0,037	90,65 ± 0,35
27	2836801 ± 44951	9,398 ± 0,149	88,11 ± 1,40	27	2826446 ± 11197	9,364 ± 0,037	88,68 ± 0,35
30	2777128 ± 20716	9,200 ± 0,069	86,25 ± 0,64	30	2781640 ± 10027	9,215 ± 0,033	87,27 ± 0,31

Tabela 56. Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych”: IP6 oraz IIP6, przechowywanych w temperaturze 4°C, sporządzonych z użyciem rozpuszczalników, poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia

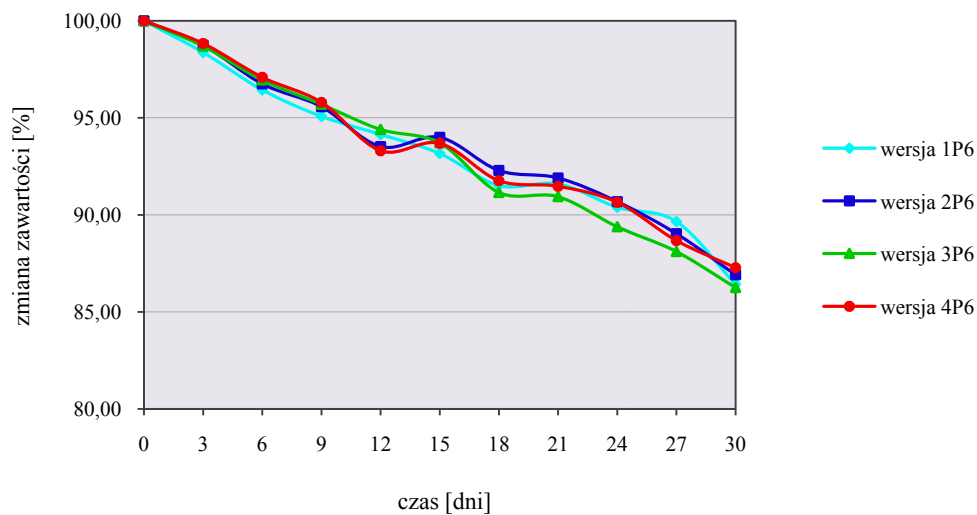
5% krople do oczu z ceftazydymem (wersje IP6 i IIP6)							
Wersja IP6				Wersja IIP6			
Dzień	Średnie pole powierzchni piklu ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]	Dzień	Średnie pole powierzchni piklu ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]
0	3138645 ± 6593	51,990 ± 0,109	100,00 ± 0,00	0	3186762 ± 11627	52,787 ± 0,193	100,00 ± 0,00
3	3097673 ± 7717	51,311 ± 0,128	98,69 ± 0,25	3	3143958 ± 9743	52,078 ± 0,161	98,66 ± 0,31
6	3029033 ± 8617	50,174 ± 0,143	96,51 ± 0,27	6	3033850 ± 10905	50,254 ± 0,181	95,20 ± 0,34
9	2978855 ± 5998	49,343 ± 0,099	94,91 ± 0,19	9	2998886 ± 1226	49,675 ± 0,020	94,10 ± 0,04
12	2918201 ± 12222	48,338 ± 0,202	92,98 ± 0,39	12	2928542 ± 15939	48,510 ± 0,264	91,90 ± 0,50
15	2892194 ± 8730	47,908 ± 0,145	92,15 ± 0,28	15	2934414 ± 4750	48,607 ± 0,079	92,08 ± 0,15
18	2837939 ± 7882	47,009 ± 0,131	90,42 ± 0,25	18	2877342 ± 3681	47,662 ± 0,061	90,29 ± 0,12
21	2821233 ± 22548	46,732 ± 0,373	89,89 ± 0,72	21	2866403 ± 16957	47,480 ± 0,281	89,95 ± 0,53
24	2772117 ± 20674	45,919 ± 0,342	88,32 ± 0,66	24	2807698 ± 2679	46,508 ± 0,044	88,11 ± 0,08
27	2709594 ± 5235	44,883 ± 0,087	86,33 ± 0,17	27	2703612 ± 5473	44,784 ± 0,091	84,84 ± 0,17
30	2635281 ± 13824	43,652 ± 0,229	83,96 ± 0,44	30	2661420 ± 11179	44,085 ± 0,185	83,51 ± 0,35

Tabela 57. Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych”: IIP6 oraz IVP6, przechowywanych w temperaturze 4°C, sporządzonych z użyciem rozpuszczalników, poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia

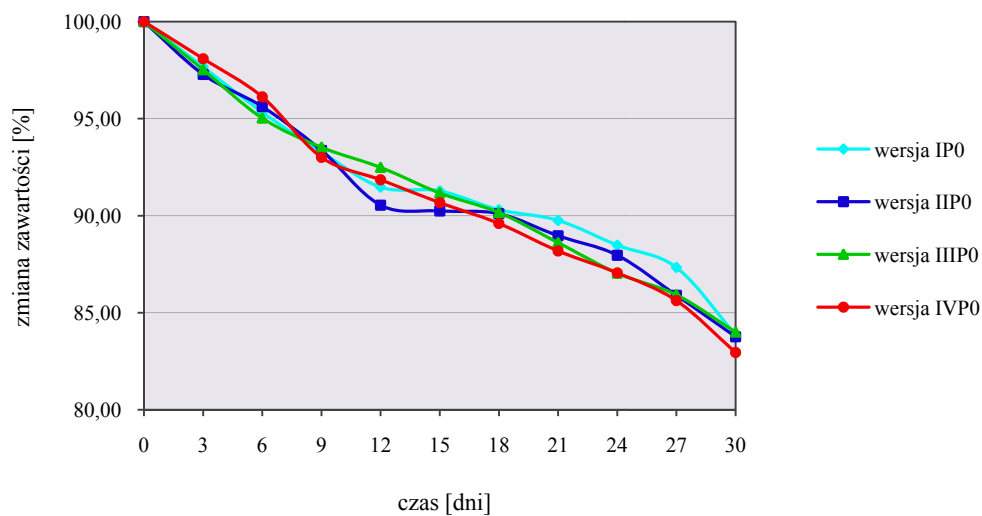
5% krople do oczu z ceftazydymem (wersje IIP6 i IVP6)							
Wersja IIP6				Wersja IVP6			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]	Dzień	Średnie pole powierzchni pików ceftazydymu ± SD	Średnie stężenie ceftazydymu ± SD [mg/ml]	Zawartość ceftazydymu w odniesieniu do zawartości początkowej ± SD [%]
0	3163864 ± 4252	52,408 ± 0,070	100,00 ± 0,00	0	3185220 ± 14604	52,761 ± 0,242	100,00 ± 0,00
3	3127090 ± 7100	51,799 ± 0,118	98,84 ± 0,22	3	3146181 ± 7467	52,115 ± 0,124	98,77 ± 0,23
6	3027107 ± 14501	50,142 ± 0,240	95,68 ± 0,46	6	3042585 ± 15827	50,399 ± 0,262	95,52 ± 0,50
9	2987921 ± 9052	49,493 ± 0,150	94,44 ± 0,29	9	3004773 ± 6216	49,772 ± 0,103	94,33 ± 0,20
12	2927540 ± 9868	48,493 ± 0,163	92,53 ± 0,31	12	2949897 ± 8517	48,863 ± 0,141	92,61 ± 0,27
15	2920614 ± 2234	48,378 ± 0,037	92,31 ± 0,07	15	2952080 ± 5410	48,900 ± 0,090	92,68 ± 0,17
18	2852407 ± 2039	47,249 ± 0,034	90,16 ± 0,06	18	2892320 ± 2674	47,910 ± 0,044	90,80 ± 0,08
21	2794141 ± 4202	46,283 ± 0,070	88,31 ± 0,13	21	2822420 ± 8340	46,752 ± 0,138	88,61 ± 0,26
24	2737157 ± 12812	45,340 ± 0,212	86,51 ± 0,40	24	2735945 ± 4215	45,319 ± 0,070	85,90 ± 0,13
27	2724622 ± 7870	45,132 ± 0,130	86,12 ± 0,25	27	2672373 ± 54851	44,266 ± 0,909	83,90 ± 1,72
30	2706453 ± 7394	44,831 ± 0,122	85,54 ± 0,23	30	2647305 ± 29284	43,851 ± 0,485	83,11 ± 0,92



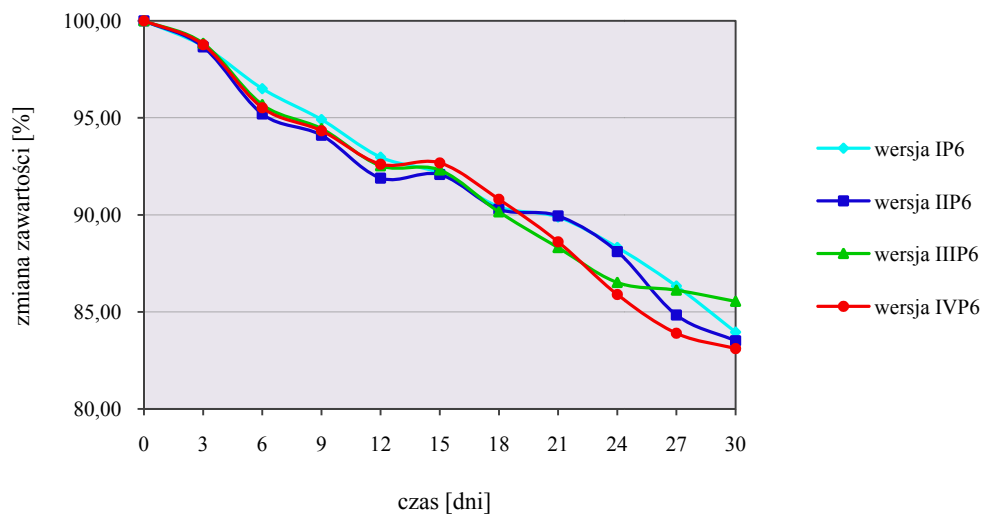
Ryc. 46. Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu w wersjach przemysłowych” P0, przechowywanych w temperaturze 4°C



Ryc. 47. Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych” P6, przechowywanych w temperaturze 4°C



Ryc. 48. Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych” P0, przechowywanych w temperaturze 4°C



Ryc. 49. Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych” P6, przechowywanych w temperaturze 4°C

12. Analiza stężenia pirydyny w kroplach do oczu z ceftazydymem

Mechanizm rozkładu ceftazydymu w roztworach wodnych jest wielokierunkowy i jego przebieg zależy od takich czynników jak temperatura, pH, czy od obecności innych substancji w roztworze. Mechanizm i produkty rozkładu ceftazydymu były przedmiotem wielu badań i licznych publikacji, przytoczonych w części teoretycznej niniejszej pracy. Degradacja ceftazydymu zawsze wiąże się z otwarciem pierścienia β -laktamowego oraz jednoczesnym odłączeniem cząsteczki pirydyny. Pirydyna należy do grupy produktów szkodliwych (grupa Xn, Dyrektywa Komisji 2001/59/WE) [151], jest ponadto wymieniona w wytycznych ICH Topic Q3C (R4) (*Impurities: Guideline for residual solvents*) [162] jako rozpuszczalnik 2 klasy w produktach farmaceutycznych, dla których określone są maksymalne dopuszczalne dobowe limity ekspozycji (PDE). PDE dla pirydyny wynosi 2 mg na dobę. Ważnym aspektem przy opracowaniu technologii kropli do oczu z ceftazydymem było stwierdzenie, czy powstająca podczas użytkowania kropli pirydyna nie osiąga toksycznych stężeń.

12.1. Warunki rozdziału chromatograficznego

Analiza ilościowa (HPLC) pirydyny była badaniem, prowadzonym jako oznaczenie dodatkowe podczas analizy ilościowej ceftazydymu w roztworach wodnych i kroplach do oczu. Warunki rozdziału chromatograficznego oraz skład i sporządzenie fazy ruchomej przedstawiono w punktach 11.1. oraz 11.2.

12.2. Analiza roztworów wzorcowych pirydyny, wykreślenie krzywych kalibracyjnych

W analizie zawartości pirydyny wykorzystano metodę wzorca zewnętrznego. Sporządzono dwie krzywe kalibracyjne, przedstawiające zależność powierzchni piku od stężenia wzorca pirydyny (GC) w wodzie ultraczystej. Otrzymane równania krzywych były podstawą do obliczenia stężeń pirydyny w oznaczanych roztworach lub kroplach.

Każda z krzywych kalibracyjnych została wykreślona na podstawie analizy 6 roztworów wzorcowych pirydyny w wodzie ultraczystej, o stężeniach zawierających się w przedziale od 2,0 µg/ml do 20 µg/ml. Każdy z roztworów wzorcowych nastrzykiwany był na kolumnę trzykrotnie.

✓ **Sporządzenie roztworów wzorcowych pirydyny**

Ze względu na bardzo niskie stężenia roztworów wzorcowych pirydyny (analiza pirydyny była analizą produktu rozkładu), w pierwszej kolejności sporządzono pomocniczy roztwór pirydyny o stężeniu 0,1%. Następnie w kolbach miarowych przygotowano szereg rozcieńczeń, uzyskując roztwory wzorcowe pirydyny o stężeniach mieszczących się w zakresie 2,0 - 20 µg/ml. Do otrzymanych roztworów wzorcowych dodano uracyl, jako marker czasu martwego. Każdy z roztworów przesączono przez sączek membranowy Chromafil o średnicy porów 0,45 µm do wialki o pojemności 1,5 ml. Wialki umieszczono w autosamplerze. Analizę chromatograficzną prowadzono według punktu 11.1., wykonując dla każdego stężenia roztworu wzorcowego po trzy nastrzyki na kolumnę. Przykładowy chromatogram roztworu wzorcowego pirydyny o stężeniu 0,01 mg/ml przedstawiono na rycinie 26. Wyniki analiz, na podstawie których wykreślono dwie krzywe kalibracyjne (A i B) pirydyny, zawarto w tabelach 58 i 59. Krzywe kalibracyjne pirydyny przedstawiają ryciny 50 i 51.

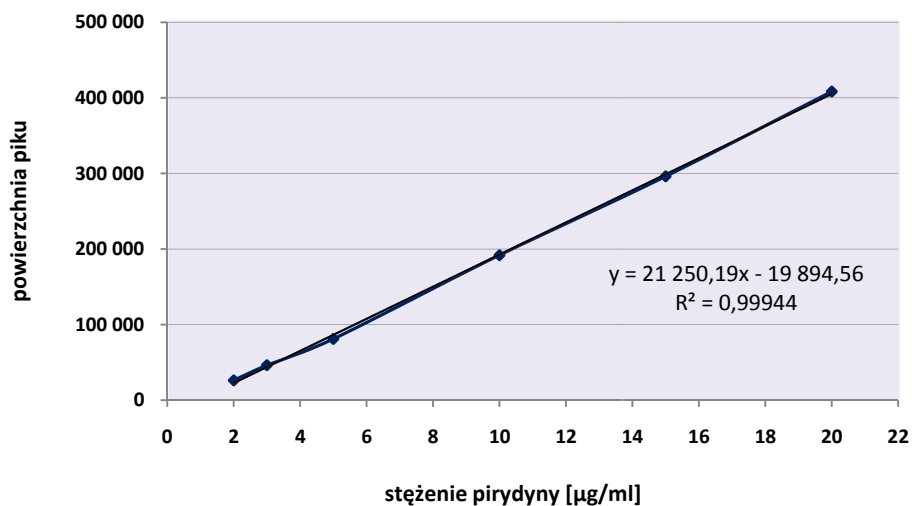
12.3. Statystyczna analiza regresji

Przeprowadzono analizę statystyczną danych, zastosowanych do wykreślenia krzywych kalibracyjnych pirydyny: dokonano oceny istotności korelacji między zmiennymi oraz oceny istotności regresji [159]. Wyniki przeprowadzonej analizy przedstawiono w tabeli 60.

Krzywa kalibracyjna A

Tabela 58. Zależność powierzchni pików od stężenia pirydyny w roztworach wzorcowych dla krzywej kalibracyjnej A

Stężenie roztworu wzorcowego pirydyny [µg/ml]	Pole powierzchni pików			Średnie pole powierzchni pików
	1	2	3	
2,00	26270	26073	26070	26138
3,00	45616	46807	46008	46144
5,00	80233	80565	82275	81024
10,00	196086	189496	189759	191780
15,00	297843	292360	297843	296015
20,00	412819	403354	408703	408292

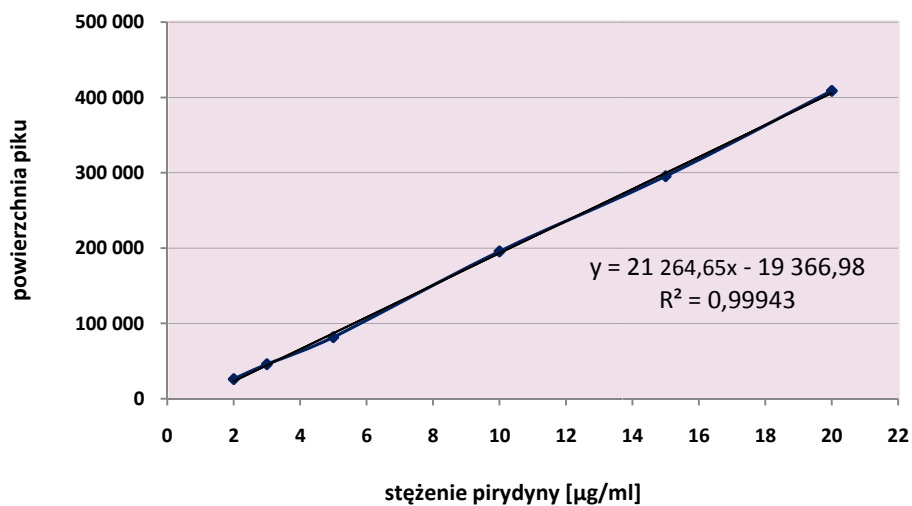


Ryc. 50. Krzywa kalibracyjna A pirydyny

Krzywa kalibracyjna B

Tabela 59. Zależność powierzchni piku od stężenia pirydyny w roztworach wzorcowych dla krzywej kalibracyjnej B

Stężenie roztworu wzorcowego pirydyny [µg/ml]	Pole powierzchni piku			Średnie pole powierzchni piku
	1	2	3	
2,00	25984	26031	26116	26044
3,00	45328	46018	46103	45816
5,00	81712	81869	81856	81812
10,00	193975	195614	197002	195530
15,00	297843	294561	293911	295438
20,00	410645	409852	405644	408714



Ryc. 51. Krzywa kalibracyjna B pirydyny

Tabela 60. Analiza regresji krzywych kalibracyjnych A i B pirydyny

Parametry oceny	Krzywa wzorcowa A	Krzywa wzorcowa B
Współczynnik korelacji r	$r = 0,99972 > r_{\alpha,f} = 0,8114$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$), co potwierdza istotność korelacji	$r = 0,99971 > r_{\alpha,f} = 0,8114$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$), co potwierdza istotność korelacji
Rozrzut wartości (S^2y)	$S^2y = 16258611,49$	$S^2y = 16718060,19$
Odchylenie standardowe (Sy)	$Sy = 4032,20$	$Sy = 4088,77$
Współczynnik regresji a	$a = 21250,21$	$a = 21264,64$
Błąd standardowy współczynnika regresji a (Sa)	$Sa = 250,63$	$Sa = 254,15$
Przedział ufności współczynnika regresji a $a \pm t_{\alpha,f} \cdot Sa$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$)	$21250,21 \pm 695,75$	$21264,64 \pm 705,51$
Istotność współczynnika regresji a ($t = a/Sa$)	$ t = 84,79 > t_{\alpha,f} = 2,776$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$), co potwierdza istotność regresji	$ t = 83,67 > t_{\alpha,f} = 2,776$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$), co potwierdza istotność regresji
Współczynnik regresji b	$b = -19894,69$	$b = -19366,79$
Błąd standardowy współczynnika regresji b (Sb)	$Sb = 2826,30$	$Sb = 2865,96$
Przedział ufności współczynnika regresji b $b \pm t_{\alpha,f} \cdot Sb$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$)	$-19894,69 \pm 7845,81$	$-19366,79 \pm 7955,89$
Istotność współczynnika regresji b ($t = b/Sb$)	$ t = 7,04 > t_{\alpha,f} = 2,776$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$), co potwierdza istotność współczynnika regresji	$ t = 6,76 > t_{\alpha,f} = 2,776$ ($\alpha = 0,05$ i $f = 4$), co potwierdza istotność współczynnika regresji
Postać równania regresji	$y = 21250,21 x - 19894,69$	$y = 21264,64 x - 19366,79$

12.4. Walidacja metody ilościowego oznaczania pirydyny w roztworach wodnych oraz kroplach do oczu

Przeprowadzona walidacja metody HPLC oznaczania pirydyny w roztworach wodnych oraz w kroplach do oczu obejmowała: specyficzność, dokładność, precyzję, liniowość w określonym zakresie stężeń oraz limity wykrywalności i oznaczalności.

12.4.1. Specyficzność

Specyficzność zastosowanej metody oznaczania pirydyny została udowodniona w punkcie 11.5.2. W czasie retencji pirydyny nie była wymywana z kolumny żadna substancja zastosowana w składzie kropli (substancja czynna ani pomocnicza). Również późniejsza analiza trwałości kropli potwierdziła specyficzność metody w odniesieniu do pojawiających się produktów rozkładu ceftazydymu: pojawiające się na chromatogramach piki produktów rozkładu nie interferowały z pikiem pirydyny.

12.4.2. Liniowość metody oznaczania ilościowego pirydyny

Liniowość metody, potwierdzająca możliwość otrzymywania wyników wprost proporcjonalnych do stężenia analitu w próbce została udowodniona dla pirydyny w zakresie stężeń: 2,0 – 20,0 µg/ml w punkcie 12.2. i 12.3. Wykazano istotność współczynnika przesunięcia (b), który został uwzględniony przy obliczaniu stężeń pirydyny na podstawie równań regresji krzywych kalibracyjnych (punkt 12.4.6.).

12.4.3. Granice wykrywalności i oznaczalności pirydyny

Granice wykrywalności i oznaczalności pirydyny w badanej próbce (w nastrzyku) określono na podstawie parametrów analizy regresji krzywych kalibracyjnych [159] i przedstawiono w tabeli 61.

$$\text{Granica wykrywalności (DL)} = 3,3 \cdot S_y / a$$

$$\text{Granica oznaczalności (QL)} = 10 \cdot S_y / a, \quad \text{gdzie:}$$

S_y – odchylenie standardowe

a – współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej

Tabela 61. Granice wykrywalności i oznaczalności pirydyny

Krzywa kalibracyjna	A	B
DL [$\mu\text{g/ml}$]	0,63	0,63
QL [$\mu\text{g/ml}$]	1,90	1,92

12.4.4. Dokładność

Dokładność oznaczeń ilościowych pirydyny wyznaczono na podstawie analizy chromatograficznej mieszanin modelowych kropli wersji 3 i III. Mieszaniny modelowe odpowiednio dla 1% oraz 5% kropli wykonano przy użyciu rozpuszczalników, które składem jakościowym i ilościowym substancji pomocniczych odpowiadały „przemysłowym” wersjom kropli: nr 3P oraz IIIP. Mieszaniny modelowe sporządzono wagowo. Dla każdej mieszaniny modelowej przygotowano po 6 próbek do nastrzyku wg punktu 11.6.3., odpowiednio dla wersji 3 i III i poddano je analizie chromatograficznej. Za miarę dokładności metody przyjęto procent odzysku, który obliczono ze wzoru:

$$\text{odzysk} = \frac{\text{stężenie oznaczone}}{\text{stężenie obliczone}} * 100\% \quad , \text{gdzie:}$$

stężenie oznaczone - stężenie pirydyny, oznaczone metodą HPLC (obliczone na podstawie powierzchni piku z równania regresji krzywej kalibracyjnej),

stężenie obliczone – stężenie pirydyny, obliczone na podstawie masy naważki pirydyny i masy sporządzonych mieszanin modelowych kropli [mg/g], przeliczone w oparciu o gęstość mieszanin na stężenie [g/ml].

Wyniki analizy dokładności oznaczania pirydyny w kroplach przedstawiono w tabelach 62 i 63.

Tabela 62. Wyniki oceny dokładności metody oznaczania ilościowego pirydyny w 1% kroplach do oczu

Numer próbki mieszaniny modelowej 1% kropli		Stężenie pirydyny obliczone [mg/g]	Gęstość mieszaniny modelowej w 25°C [g/ml]	Stężenie pirydyny obliczone [mg/ml]	Pole powierzchni pików pirydyny	Stężenie pirydyny oznaczone [mg/g]	Odzysk [%]	Wz [%]
	1	0,309	1,0205	0,315	47786	0,316	100,18	
	2				48183	0,318	100,77	
	3				47104	0,313	99,16	
	4				48095	0,317	100,64	
	5				48103	0,317	100,65	
	6				48026	0,317	100,54	
wartość średnia ± SD					47882 ± 405	0,316 ± 0,002	100,32 ± 0,60	0,60
	1	0,503	1,0215	0,514	86937	0,500	97,24	
	2				87309	0,502	97,58	
	3				86034	0,496	96,41	
	4				89361	0,511	99,45	
	5				87987	0,505	98,20	
	6				86892	0,500	97,19	
wartość średnia ± SD					87420 ± 1143	0,502 ± 0,005	97,68 ± 1,05	1,07
	1	0,590	1,0208	0,602	111629	0,616	102,28	
	2				107274	0,596	98,88	
	3				107093	0,595	98,74	
	4				109830	0,608	100,88	
	5				109 356	0,605	100,51	
	6				109219	0,605	100,40	
wartość średnia ± SD					109067 ± 1695	0,604 ± 0,008	100,28 ± 1,32	1,32

Tabela 63. Wyniki oceny dokładności metody oznaczania ilościowego pirydyny w 5% kroplach do oczu

Numer próbki mieszaniny modelowej 5% kropli		Stężenie pirydyny obliczone [mg/g]	Gęstość mieszaniny modelowej w 25°C [g/ml]	Stężenie pirydyny obliczone [mg/ml]	Pole powierzchni pików pirydyny	Stężenie pirydyny oznaczone [mg/g]	Odzysk [%]	Wz [%]
	1	2,097	1,0236	2,146	71645	2,140	99,72	
	2				72098	2,151	100,21	
	3				72672	2,164	100,84	
	4				70327	2,109	98,27	
	5				70619	2,116	98,59	
	6				71903	2,146	100,00	
wartość średnia ± SD					71544 ± 901	2,138 ± 0,021	99,61 ± 0,99	0,99
	1	2,512	1,0225	2,569	86937	2,500	97,30	
	2				88910	2,546	99,10	
	3				86649	2,493	97,04	
	4				87069	2,503	97,42	
	5				86987	2,501	97,34	
	6				88892	2,546	99,09	
wartość średnia ± SD					87574 ± 1038	2,515 ± 0,024	97,88 ± 0,95	0,97
	1	2,976	1,0203	3,037	107822	2,991	98,48	
	2				109439	3,029	99,73	
	3				111853	3,085	101,60	
	4				108903	3,016	99,32	
	5				108 039	2,996	98,65	
	6				107294	2,978	98,07	
wartość średnia ± SD					108892 ± 1643	3,016 ± 0,039	99,31 ± 1,27	1,28

12.4.5. Precyzja

Precyzję metody oznaczania pirydyny w 1% i 5% kroplach do oczu, określoną przez odchylenie standardowe (SD) i procent względnego odchylenia standardowego, czyli współczynnik zmienności (Wz), przedstawiono w tabelach: 62 i 63.

12.4.6. Zawartość pirydyny w badanym materiale

Zawartość pirydyny w roztworach wodnych i kroplach do oczu obliczana była ze wzorów otrzymanych z przekształcenia równań regresji krzywych kalibracyjnych pirydyny:

- ❖ dla 1% wersji roztworów wodnych i kropli z ceftazydymem:

$$x = \frac{(y - b) \cdot 100}{a \cdot 1000}$$

- ❖ dla 5% wersji roztworów wodnych i kropli z ceftazydymem:

$$x = \frac{(y - b) \cdot 500}{a \cdot 1000}$$

gdzie:

- x** – stężenie pirydyny [mg/ml] w badanych roztworach i kroplach
- y** – uśrednione pole powierzchni pików pirydyny
- a** – współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej
- b** – współczynnik przesunięcia (wykazano istotność współczynnika b: punkt 12.3.)
- 100** lub **500** – współczynnik rozcieńczenia dla roztworów i kropli 1% lub 5%
- 1000** – przeliczenie jednostek: z [µg/ml] na [mg/ml]

W celu obliczenia zawartości pirydyny w roztworach wodnych i kroplach do oczu korzystano z jednej z dwóch krzywych kalibracyjnych pirydyny. Zawartość pirydyny w wersjach recepturowych o niemodyfikowanej lepkości liczona była na podstawie krzywej kalibracyjnej A, dla kropli recepturowych o modyfikowanej lepkości zastosowano krzywą kalibracyjną B. W przypadku kropli w wersjach „przemysłowych”, które były

przechowywane tylko w temperaturze 4°C, stężenie pirydyny w ciągu 30 dni przechowywania nie przekroczyło limitu oznaczalności, dlatego nie wykreślano dodatkowych krzywych kalibracyjnych dla wersji „przemysłowych”.

Analiza HPLC zawartości pirydyny była analizą produktu rozkładu. Oznaczenie prowadzono jednocześnie z analizą zawartości ceftazydymu w roztworach wodnych i kroplach do oczu. Wyniki oznaczeń zawartości pirydyny w roztworach wodnych i kroplach do oczu z ceftazydymem przedstawiono w tabelach 64 - 66:

- ✓ bezpośrednio po sporządzeniu roztworów wodnych oraz kropli do oczu z ceftazydymem,
- ✓ w ostatnim dniu trwałości roztworów wodnych i kropli, limitowanej zawartością ceftazydymu, nie niższą niż 90% zawartości początkowej,
- ✓ w 30 dniu analizy roztworów wodnych i kropli.

Tabela 64. Stężenie pirydyny w 1% roztworach wodnych i kroplach do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych

❖ Stężenie pirydyny w 1% roztworach wodnych i kroplach bezpośrednio po sporządzeniu:				
✓ poniżej 0,063 mg/ml (poniżej DL*) dla wszystkich wersji				
❖ Stężenie pirydyny w 1% roztworach wodnych i kroplach przechowywanych w temperaturze 4°C				
✓ w ostatnim dniu trwałości: poniżej 0,192 mg/ml (poniżej QL*) dla wszystkich wersji				
✓ w 30 dniu analizy: poniżej 0,192 mg/ml (poniżej QL*) dla wszystkich wersji				
❖ Stężenie pirydyny w 1% roztworach wodnych i kroplach przechowywanych w temperaturze 20°C				
✓ w ostatnim dniu trwałości: poniżej 0,192 mg/ml (poniżej QL*) dla wszystkich wersji				
✓ w 30 dniu analizy:				
wersja 0_(1%)	wersja 1R	wersja 2R	wersja 3R	wersja 4R
0,603 ± 0,014 mg/ml	0,640 ± 0,010 mg/ml	0,708 ± 0,015 mg/ml	0,640 ± 0,022 mg/ml	0,652 ± 0,009 mg/ml

* limity DL i QL przeliczono na stężenia pirydyny w kroplach, odpowiednie dla 1% wersji

Tabela 65. Stężenie pirydyny w 5% roztworach wodnych i kroplach do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych

❖ Stężenie pirydyny w 5% roztworach wodnych i kroplach bezpośrednio po sporządzeniu:				
✓ poniżej 0,315 mg/ml (poniżej DL*) dla wszystkich wersji				
❖ Stężenie pirydyny w 5% roztworach wodnych i kroplach przechowywanych w temperaturze 4°C				
✓ w ostatnim dniu trwałości: poniżej 0,960 mg/ml (poniżej QL*) dla wszystkich wersji				
✓ w 30 dniu analizy: poniżej 0,960 mg/ml (poniżej QL*) dla wszystkich wersji				
❖ Stężenie pirydyny w 5% roztworach wodnych i kroplach przechowywanych w temperaturze 20°C				
✓ w ostatnim dniu trwałości: poniżej 0,960 mg/ml (poniżej QL*) dla wszystkich wersji				
✓ w 30 dniu analizy:				
wersja 0_(5%)	wersja IR	wersja IIR	wersja IIIR	wersja IVR
3,701 ± 0,053 mg/ml	3,770 ± 0,073 mg/ml	4,069 ± 0,090 mg/ml	3,773 ± 0,071 mg/ml	4,099 ± 0,072 mg/ml

* limity DL i QL przeliczono na stężenia pirydyny w kroplach, odpowiednie dla 5% wersji

Tabela 66. Stężenie pirydyny w 1% i 5% kroplach do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych” P0 i P6

❖ Stężenie pirydyny w kroplach „przemysłowych” bezpośrednio po sporządzeniu:		
	1% krople	5% krople
	poniżej 0,063 mg/ml (poniżej DL*) dla wszystkich wersji	poniżej 0,315 mg/ml (poniżej DL*) dla wszystkich wersji
❖ Stężenie pirydyny w kroplach „przemysłowych” przechowywanych w temperaturze 4°C		
	1% krople	5% krople
✓ w ostatnim dniu trwałości:	poniżej 0,192 mg/ml (poniżej QL*) dla wszystkich wersji	poniżej 0,960 mg/ml (poniżej QL*) dla wszystkich wersji
✓ w 30 dniu analizy:	poniżej 0,192 mg/ml (poniżej QL*) dla wszystkich wersji	poniżej 0,960 mg/ml (poniżej QL*) dla wszystkich wersji

* limity DL i QL przeliczono na stężenia pirydyny w kroplach, odpowiednie dla 1% i 5% wersji

V OMÓWIENIE WYNIKÓW

W leczeniu bakteryjnych zakażeń narządu wzroku stosowane są obecnie, jako leki pierwszego rzutu, antybiotyki aminoglikozydowe. Aminoglikozydy powodują jednak wiele działań niepożądanych, zarówno po podaniu ogólnym (ototoksyczność, zaburzenia pracy nerek i wątroby), jak i miejscowym (uszkodzenie tkanek oka, uszkodzenie słuchu), a także są przyczyną częstych reakcji alergicznych. Wzrastająca liczba bakteryjnych zakażeń okulistycznych, spowodowanych między innymi coraz powszechniejszym stosowaniem soczewek kontaktowych oraz znaczna oporność bakterii na aminoglikozydy wskazuje na potrzebę opracowania nowej okulistycznej postaci leku do stosowania miejscowego, zawierającej antybiotyk nowszej generacji.

Ceftazydym należy do antybiotyków cefalosporynowych III generacji. Charakteryzuje się szerokim spektrum przeciwdrobnoustrojowym. Szczególnie silne działanie wykazuje wobec bakterii Gram-ujemnych, m. in.: *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Acinetobacter*, pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*: *Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Salmonella* i *Shigella*. Nie ustępuje skutecznością aminoglikozydom, jest natomiast od nich znacznie mniej toksyczny [31-33, 58, 64, 74-75]. Aktywność ceftazydymu w zakażeniach wewnątrzgałkowych o etiologii *Pseudomonas aeruginosa* jest większa od piperacyliny, określanej często jako penicylina *anti-Pseudomonas*. Istotną zaletą ceftazydymu jest ponadto jego oporność na działanie klasycznych β -laktamaz typu TEM, SHV i PSE-1. Ceftazydym stosowany jest obecnie m.in. w ciężkich zakażeniach dolnych dróg oddechowych, moczowych, posocznicy, zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych, zakażeniach skóry, nosa, ucha, gardła - w postaci iniekcji domięśniowych i dożylnych. Zarejestrowane handlowe preparaty ceftazydymu stanowią suchą, liofilizowaną postać do sporządzania roztworów do wstrzykiwań domięśniowych i dożylnych oraz do wlewów.

Pomimo znakomitych przeciwdrobnoustrojowych właściwości ceftazydymu i jego niskiej toksyczności względem tkanek oka, na krajowym i światowym rynku farmaceutycznym brakuje okulistycznej postaci leku z ceftazydymem do stosowania miejscowego. Główną przyczyną tego stanu rzeczy jest niska trwałość tego antybiotyku w roztworach wodnych, co wyklucza możliwość przemysłowej produkcji kropli do oczu z ceftazydymem w postaci roztworu. Ceftazydym w roztworach wodnych ulega szybkiej degradacji, w wyniku której następuje otwarcie pierścienia β -laktamowego

z jednoczesnym odłączeniem cząsteczki pirydyny [115-120]. Krople do oczu z ceftazydymem przygotowywane są jedynie *ex tempore* w aptekach szpitalnych, wyłącznie na potrzeby pacjentów oddziałów okulistycznych. Zazwyczaj krople te wykonywane są przez rozpuszczenie parenteralnej postaci ceftazydymu w różnym vehiculum, np. w 0,9% roztworze NaCl lub w preparacie sztucznych łez [107-109]. Brakuje danych w piśmiennictwie naukowym, dotyczących technologii okulistycznych postaci leku z ceftazydymem, np. kropli lub maści, w tym sposobu ich sporządzania, doboru niezbędnych substancji pomocniczych oraz trwałości antybiotyku w tych postaciach leku.

Krople do oczu z antybiotykiem o tak szerokim spektrum przeciwdrobnoustrojowym i niskiej toksyczności jaką charakteryzuje się ceftazydym, mogłyby stać się lekiem pierwszego rzutu w ciężkich chorobach bakteryjnych narządu wzroku, w szczególności w zakażeniach pałeczką *Pseudomonas aeruginosa*, która wykazuje znaczną oporność na stosowane obecnie antybiotyki.

W 1999 r. pod kierownictwem dr hab. n. farm. Anny Kodym rozpoczęto badania nad zastosowaniem w kroplach do oczu niektórych antybiotyków cefalosporynowych. Badania prowadzone były w Katedrze i Zakładzie Technologii Postaci Leku Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu i ich celem było opracowanie technologii 1% kropli do oczu z cefalosporynami, w tym również ocena wpływu substancji pomocniczych i temperatury przechowywania na aktywność przeciwdrobnoustrojową cefalosporyn w kroplach. Wyniki badań pozwoliły między innymi na opatentowanie pełnej technologii sporządzania 1% recepturowych kropli do oczu z ceftazydymem [139, 163, 164]. Zapoczątkowane w Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu badania były kontynuowane w ostatnich latach przez zespół naukowy A. Kodym w Katedrze i Zakładzie Technologii Postaci Leku Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Badania te dotyczyły technologii i trwałości fizykochemicznej kropli do oczu z cefazoliną [165], cefuroksymem [166, 167] i cefepimem [168], a także technologii kropli do oczu z ceftazydymem [152], która jest tematem tej pracy.

W niniejszej pracy do składu kropli włączono te same substancje pomocnicze, których użyto wcześniej przy opracowaniu technologii 1% kropli recepturowych [139]. Badania rozszerzono ponadto o trwałość chemiczną 5% kropli z ceftazydymem, czyli kropli „wzmocnionych” – do stosowania w warunkach klinicznych oraz o technologię i trwałość 1% i 5% kropli w wersjach „przemysłowych”.

Krople recepturowe oraz „przemysłowe” zaprojektowano w dwóch stężeniach: 1% i 5%, w wersjach zarówno konserwowanych jak i bez konserwantów, a także w wersjach o zwiększonej lepkości. Substancje pomocnicze zostały tak dobrane, aby krople posiadały optymalne właściwości z punktu widzenia trwałości antybiotyku oraz parametry fizyczne zgodne z wymaganiami farmakopealnymi i leżące w granicach tolerancji oka: pH, ciśnienie osmotyczne oraz lepkość.

Założeniem niniejszej pracy jest odpowiedź na realne zapotrzebowanie kliniczne na preparat z ceftazydymem w postaci kropli do oczu o trwałości umożliwiającej przeprowadzenie pełnej kuracji w warunkach klinicznych lub w domu przez pacjenta, produkowanych recepturowo lub dostępnych jako gotowy preparat handlowy. Przyjęte założenia dotyczą opracowania technologii:

- ✓ 1% i 5% recepturowych kropli do oczu, sporządzanych na podstawie recepty lekarskiej w warunkach receptury aptecznej, o trwałości umożliwiającej kilkunastodniową kurację przez pacjenta w domu, lub przeznaczonych do stosowania w warunkach klinicznych i sporządzanych przez apteki szpitalne na zapotrzebowanie oddziałów okulistycznych,
- ✓ 1% i 5% kropli do oczu w wersjach „przemysłowych”, czyli w wersjach, których technologia i trwałość umożliwia przemysłową produkcję kropli. Ze względu na niską trwałość ceftazydymu w roztworach wodnych – słuszną wydaje się być założona w niniejszej pracy koncepcja technologiczna, oparta na opakowaniu dwukomorowym, zawierającym osobno antybiotyk oraz rozpuszczalnik, które byłyby łączone przed pierwszą aplikacją.

Ponieważ cele i założenia niniejszej pracy realizowano etapowo, uzyskane wyniki omówiono poniżej zgodnie z następującymi po sobie etapami.

1. Analiza zgodności farmaceutycznej 5% roztworu ceftazydymu z substancjami pomocniczymi, włączonymi do składu kropli

W pierwszym etapie badań wykonano test zgodności farmaceutycznej 5% roztworów wodnych ceftazydymu 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: ceftazydym w stężeniu 5% wykazał pełną zgodność ze składnikami buforu cytrynianowego, z alkoholem poliwinylowym w stężeniu około 3%, z boranem fenylortęciowym w stężeniu 0,001% oraz z alkoholem β-feniloetylowym w stężeniu 0,4%. Wszystkie sporządzone roztwory pozostały przezroczyste przez cały okres badania. Zaobserwowano natomiast zmianę zabarwienia, która intensywniej przebiegała w temperaturze przechowywania 20°C. Przyczyną zmiany zabarwienia była degradacja antybiotyku, niezależna od obecnych w roztworze substancji pomocniczych, ponieważ identyczne zmiany zaobserwowano w przechowywanym równolegle roztworze kontrolnym, zawierającym sam antybiotyk.

2. Technologia i właściwości fizyczne roztworów substancji pomocniczych, zastosowanych w składzie kropli do oczu

Krople do oczu z ceftazydymem oraz rozpuszczalniki do kropli w wersjach „przemysłowych” sporządzone zostały z użyciem roztworów substancji pomocniczych, takich jak: bufor cytrynianowy I i II, 0,04% roztwór boranu fenylortęciowego oraz roztwór alkoholu poliwinylowego, których tok sporządzania opisano w punkcie 4 niniejszej pracy². W ramach oceny jakościowej buforów cytrynianowych, przed procesem wyjaławiania oraz bezpośrednio po nim wykonano pomiary pH i ciśnienia osmotycznego oraz przeprowadzono ocenę organoleptyczną pod kątem zmian zabarwienia oraz przezroczystości, a w przypadku roztworu alkoholu poliwinylowego dodatkowo oznaczono lepkość. Na podstawie przeprowadzonej oceny fizycznej nie stwierdzono istotnych zmian w wyniku procesu wyjaławiania w badanych buforach cytrynianowych (tabela 2), natomiast w roztworze alkoholu poliwinylowego nastąpiło nieznaczne obniżenie lepkości z wartości 43,20 mPa·s do 42,11 mPa·s (tabela 4).

² Odnośniki w *Omówieniu Wyników* do określonych punktów pracy dotyczą *Części Doświadczalnej* pracy, chyba że podano inaczej.

3. Opracowanie i walidacja metody HPLC, zastosowanej do oznaczeń ilościowych ceftazydymu w roztworach wodnych i kroplach do oczu

W niniejszej pracy trwałość chemiczna kropli do oczu z ceftazydymem określana była na podstawie zmian zawartości ceftazydymu w kroplach w trakcie ich przechowywania. Zawartość ceftazydymu oznaczana była za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), metodą wzorca zewnętrznego, z wykorzystaniem elucji izokratycznej. Zastosowane warunki rozdziału zgodne były z warunkami podanymi w monografii ceftazydymu w USP 29, jednak ze względu na konieczność zwiększenia zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej (punkt 11.1), wykonano całościową walidację metody HPLC, obejmującą specyficzność, liniowość w określonym przedziale stężeń, limity wykrywalności i oznaczalności, dokładność, precyzję oraz oznaczenie *Robustness*, czyli oznaczenie odporności metody [160].

Specyficzność. W badaniu specyficzności (punkt 11.5.2.) wykazano, że cytrynian sodu, kwas cytrynowy, boran fenylortęciowy, alkohol β -fenyloetylowy oraz alkohol poliwinylowy, zastosowane w składzie kropli do oczu, nie miały wpływu na wynik oznaczeń ceftazydymu, ponieważ przy długości fali 254 nm i w czasie retencji charakterystycznym dla antybiotyku na chromatogramach nie pojawiały się piki pochodzące od zastosowanych substancji pomocniczych (pik alkoholu β -fenyloetylowego wymywany był z kolumny w czasie retencji znacznie przewyższającym czas retencji ceftazydymu). Zastosowana metoda HPLC pozostała specyficzna również w trakcie przechowywania kropli, kiedy zaczęły pojawiać się na chromatogramach piki produktów rozkładu ceftazydymu. Pik głównego produktu rozkładu ceftazydymu - pirydyny, charakteryzował się odmiennym niż oznaczany antybiotyk czasem retencji a także odpowiednią rozdzielczością, umożliwiającą dodatkowe oznaczenie ilościowe pirydyny.

Liniowość metody. W ciągu całego cyklu badań sporządzono trzy krzywe kalibracyjne dla ceftazydymu w zakresie stężeń od 25 $\mu\text{g/ml}$ do 150 $\mu\text{g/ml}$, czyli obejmujące zakres 25% - 150% w odniesieniu do oczekiwanych wyników analizy świeżo sporządzonych roztworów wodnych i kropli z ceftazydymem (punkt 11.3.). Przeprowadzona analiza regresji potwierdziła istotność korelacji między stężeniem wzorca ceftazydymu w analizowanych próbach a oznaczanym polem powierzchni piku (punkt 11.4.).

Granica wykrywalności (DL) i granica oznaczalności (QL). Zgodnie z wytycznymi ICH Q2 (R1) [160], granica oznaczalności (QL) powinna być wyznaczona w przypadku analizy ilościowej zanieczyszczeń lub analizy ilościowej produktów rozkładu. Ze względu na fakt, że przeprowadzone badania były badaniami trwałości substancji czynnej w postaci leku i w trakcie przechowywania następował spadek zawartości analitu – parametry DL oraz QL dla ceftazydymu zostały również wyznaczone. Granicę wykrywalności oraz granicę oznaczalności określono na podstawie parametrów analizy regresji krzywych kalibracyjnych ceftazydymu (punkt 11.5.4.). Wyznaczenie DL i QL przeprowadzono dla każdej z trzech krzywych kalibracyjnych ceftazydymu, przy czym najwyższe wartości uzyskano dla krzywej kalibracyjnej C, gdzie granica wykrywalności (DL) ceftazydymu wyniosła 2,15 µg/ml, a granica oznaczalności (QL) wyniosła 6,52 µg/ml. Wartości obu wyznaczonych parametrów znajdują się poniżej dolnej granicy zakresu metody, wyznaczonego przez krzywe kalibracyjne (poniżej 25 µg/ml), co potwierdza możliwość oznaczeń ilościowych ceftazydymu w granicach obranego zakresu metody.

Dokładność. Za miarę dokładności przyjęto procent odzysku ceftazydymu z mieszanin modelowych o określonej zawartości antybiotyku (punkt 11.5.5.). Dokładność oznaczeń ceftazydymu w 1% kroplach wyniosła od 97,64% do 98,54%, natomiast w 5% kroplach od 96,70 % do 98,49%.

Precyzja. Precyzję oznaczeń ilościowych ceftazydymu w badanych kroplach określono na podstawie analizy HPLC mieszanin modelowych antybiotyku (punkt 11.5.6.), jako procent względnego odchylenia standardowego, czyli współczynnik zmienności (Wz). Współczynnik zmienności, obliczony na podstawie pól powierzchni otrzymanych z trzech nastrzyków dla każdej mieszaniny modelowej, wyniósł dla 1% kropli od 0,07% do 0,24%, natomiast dla 5% kropli od 0,11% do 0,33%.

Robustness. Oznaczenie *Robustness*, czyli oznaczenie odporności metody, przeprowadzono dla parametru, który mógł w trakcie trwania analizy ulegać zmianie, czyli dla zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej. Oznaczenie przeprowadzono poddając analizie chromatograficznej roztwór wzorcowy ceftazydymu, stosując kolejno trzy fazy ruchome, różniące się zawartością acetonitrylu: 90%, 100% i 110% w odniesieniu do ilości acetonitrylu, zastosowanej w analizie roztworów i kropli. Uzasadnienie wyboru jednego zmiennego parametru oraz przeprowadzenie analizy opisano w punkcie 11.5.7. Analizując

uzyskane wyniki (tabela 38) zaobserwowano, że zwiększenie stężenia acetonitrylu w fazie ruchomej powodowało zwiększenie mocy elucyjnej, czyli zdolności wymywania ceftazydymu z kolumny, co skutkowało obniżeniem czasu retencji (t_R) antybiotyku. 10% zwiększenie zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej powodowało skrócenie czasu retencji z 9,48 minut do 8,53 minut, natomiast 10% obniżenie jego zawartości - powodowało wydłużenie czasu retencji do 11,04 minut. Nie odnotowano natomiast wpływu zastosowanych zmian stężenia acetonitrylu na uzyskiwane powierzchnie pików analitu, a tym samym na obliczoną zawartość antybiotyku w badanych próbach: dla trzech średnich pól powierzchni uzyskanych z analizy roztworu wzorcowego ceftazydymu przy użyciu trzech faz ruchomych różniących się zawartością acetonitrylu: 90%, 100% i 110% (w odniesieniu do ilości zastosowanej w badaniach) uzyskano współczynnik zmienności $Wz = 0,13\%$ (tabela 38).

Parametry rozdziału chromatograficznego.

Prowadząc analizę HPLC roztworów wodnych oraz kropli do oczu z ceftazydymem wyznaczano szereg parametrów chromatograficznych, których wartości świadczyły o sprawności kolumny oraz stałych warunkach prowadzonych rozdzielów. Przykładowe wartości wyznaczonych parametrów dla każdej wersji kropli oraz dla roztworów wodnych zestawiono w tabeli 39. Średni czas retencji ceftazydymu wynosił 9,43 minut, średnia wartość współczynnika retencji wynosiła 2,482. Rozdzielczość dla pików ceftazydymu w kroplach bezpośrednio po sporządzeniu była nie mniejsza niż 2,305. Podczas przechowywania, gdy zaczęły pojawiać się piki produktów rozkładu, rozdzielczość dla pików ceftazydymu malała. Współczynnik ogonowania pików ceftazydymu wynosił 0,836 – 1,008 i spełniał wymagania USP 29: 0,75 – 1,5. Liczba pól teoretycznych wynosiła średnio około 17 tysięcy/metr, przy czym najwyższą sprawność notowano na początku każdej serii analiz, najniższą w ostatnich dniach analizy. Po każdej serii analiz kolumna była wielokrotnie płukana mieszaniną metanolu i wody, co powodowało wzrost jej sprawności, obniżanej w czasie trwania analiz prawdopodobnie przez bufor fosforanowy, będący składnikiem fazy ruchomej.

Przykładowe chromatogramy oraz parametry rozdziału chromatograficznego ceftazydymu w 1% i 5% kropach w wersjach recepturowych i „przemysłowych”, w dniu sporządzenia i w 30 dniu przechowywania, przedstawiono na rycinach 28 - 41 oraz w tabeli 39.

4. Technologia i trwałość 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych.

Krople z ceftazydymem o stężeniu 1% i 5% zaprojektowano w czterech wersjach recepturowych, których skład przedstawiono w tabeli 14. Dodatkowo sporządzono 1% i 5% roztwory wodne ceftazydymu, które ze względu na zbyt niskie ciśnienie osmotyczne nie nadają się do stosowania w celach terapeutycznych i zostały sporządzone oraz były analizowane jedynie w celach porównawczych. Uzasadnienie składu z punktu widzenia wpływu zastosowanych substancji pomocniczych na trwałość fizykochemiczną kropli przedstawiono w punkcie 8.2.

Z punktu widzenia terapii – wybór stężenia oraz odpowiedniej wersji kropli zależy od intensywności zakażenia bakteryjnego narządu wzroku oraz od czynników towarzyszących, takich jak np. stan nabłonka rogówki czy tolerancja oka na środki konserwujące. Krople w wersjach 1R i 1R – o niemodyfikowanej lepkości i niekonserwowane - przeznaczone są do stosowania w początkowym, ostrym etapie zakażenia, w którym nie jest wskazane stosowanie kropli zawierających środki konserwujące i zwiększające lepkość. Ponadto krople te mogą być stosowane w przypadku uszkodzenia rogówki lub nietolerancji na środki konserwujące. Krople w wersjach 2R i 2R – konserwowane o niemodyfikowanej lepkości - mogą być stosowane po opanowaniu ostrej fazy zakażenia u pacjentów, u których nie ma przeciwwskazań do stosowania kropli zawierających środki konserwujące. Zwiększenie lepkości kropli (wersje 3R, 4R, 3R i 4R) ma na celu wydłużenie kontaktu leku z okiem, co pozwala na zmniejszenie częstotliwości aplikacji. Krople zawierające alkohol poliwinylowy mogą być stosowane w przypadku infekcji o łagodnym przebiegu lub po opanowaniu fazy ostrej zakażenia, przy czym krople niekonserwowane (wersje 3R i 3R) zalecane są w przypadku przeciwwskazań do stosowania środków konserwujących. Zastosowanie środków konserwujących w wersjach 2R, 2R, 4R oraz 4R umożliwia sporządzanie kropli w opakowaniach wielodawkowych, co jest korzystne ekonomicznie.

Wszystkie wersje kropli oraz roztwory wodne ceftazydymu zostały sporządzone w warunkach aseptycznych, zgodnie z metodyką przedstawioną w punktach 7 i 8. Każda z wersji została rozdzielona na dwie serie, które były analizowane osobno. Roztwory wodne i krople przechowywano w chłodziarkach farmaceutycznych w temperaturze 4°C i 20°C przez okres 30 dni. Bezpośrednio po sporządzeniu

oraz w trakcie przechowywania, w odstępach trzydniowych, dokonywano oceny jakościowej roztworów wodnych i kropli z ceftazydymem, w ramach której oznaczano: pH, ciśnienie osmotyczne, zabarwienie i przezroczystość oraz prowadzono analizę zmian zawartości ceftazydymu (metoda HPLC). Ponadto w wersjach zawierających w składzie alkohol poliwinylowy oznaczano lepkość.

Analiza zawartości ceftazydymu w kroplach w trakcie ich przechowywania umożliwiła wyznaczenie okresu trwałości każdej wersji kropli. Okres trwałości podano jako czas [ilość dni], w którym zawartość antybiotyku pozostała na poziomie nie mniejszym niż 90% w odniesieniu do zawartości początkowej. Zmiany fizyczne, jakie odnotowano w okresie trwałości każdej wersji kropli były nieznaczne, dlatego w *Omówieniu Wyników* trwałość fizyczną kropli przedstawiono w oparciu o wyniki całkowitej, 30-dniowej analizy każdej wersji. Pozwoliło to na lepsze zaobserwowanie zależności pomiędzy składem i temperaturą przechowywania kropli a kierunkiem i wielkością zmian parametrów fizycznych, jakie zaszły w kroplach w trakcie przechowywania.

pH 1% kropli w dniu sporządzenia mieściło się w granicach od 6,21 (wersja 4R) do 6,32 (wersja 1R). W czasie 30 dni przechowywania w obu warunkach temperaturowych pH 1% kropli pozostawało praktycznie na niezmiennym poziomie: po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C pH 1% kropli mieściło się w granicach: od 6,20 (wersja 4R) do 6,30 (wersja 1R), natomiast po 30 dniach przechowywania w temperaturze 20°C pH 1% kropli wynosiło: od 6,19 (wersja 4R) do 6,29 (wersja 1R). Dla porównania 1% roztwór wodny ceftazydymu w dniu sporządzenia charakteryzował się wyższym niż buforowane krople pH, które wynosiło 7,53 i w trakcie przechowywania obniżało się systematycznie. W 30 dniu analizy pH 1% roztworu wodnego przechowywanego w temperaturze 4°C wynosiło 7,30, natomiast przechowywanego w temperaturze 20°C wynosiło 7,24.

pH 5% kropli w dniu sporządzenia charakteryzowało się nieznacznie wyższym pH w porównaniu z 1% kroplami. pH mieściło się w granicach od 6,35 (wersja IVR) do 6,48 (wersja IR). W ciągu 30 dni przechowywania w obu warunkach temperaturowych pH kropli nieznacznie obniżyło się: w 30 dniu przechowywania w temperaturze 4°C pH 5% kropli wynosiło: od 6,27 (wersja IVR) do 6,40 (wersja IR), natomiast w 30 dniu przechowywania w temperaturze 20°C pH 5% kropli wynosiło: od 6,27 (wersja IVR)

do 6,38 (wersja IR). 5% wodny roztwór ceftazydymu w porównaniu z 1% roztworem analogicznie charakteryzował się wyższym pH, dla którego bezpośrednio po sporządzeniu odnotowano wartość pH 7,75. W trakcie przechowywania pH 5% roztworu wodnego obniżało się, aby w 30 dniu analizy osiągnąć wartości pH: 7,35 dla temperatury przechowywania 4°C oraz 7,05 dla temperatury przechowywania 20°C.

Z uwagi na fakt, że ceftazydym wykazuje najwyższą trwałość w roztworach o pH 4,5 - 6,5 [115] - wyniki przeprowadzonych oznaczeń potwierdzają konieczność buforowania kropli do oczu z ceftazydymem a także potwierdzają słuszność wyboru buforu cytrynianowego, który gwarantuje nie tylko odpowiednie wyjściowe pH dla 1% i 5% kropli we wszystkich analizowanych wersjach, ale także zapewnia praktycznie niezmiennie pH kropli w trakcie przechowywania. Dodatkowym atutem zastosowanego buforu cytrynianowego jest fakt, że osiągnięte wartości pH są dobrze tolerowane przez oko.

Wyniki badań pH wodnych roztworów oraz kropli recepturowych z ceftazydymem zestawiono w tabelach 17 i 18.

Ciśnienie osmotyczne 1% kropli z ceftazydymem w dniu sporządzenia mieściło się w granicach od 332 mOsm/l (wersja 1R) do 386 mOsm/l (wersja 4R). W trakcie 30 dni przechowywania w obu warunkach temperaturowych ciśnienie osmotyczne kropli wzrastało, by w 30 dniu analizy osiągnąć wartości: dla temperatury przechowywania 4°C: od 334 mOsm/l (wersja 1R) do 393 mOsm/l (wersja 4R), dla temperatury przechowywania 20°C: od 346 mOsm/l (wersja 1R) do 403 mOsm/l (wersja 4R). Dla porównania: 1% roztwór wodny ceftazydymu w dniu sporządzenia charakteryzował się dużo niższym niż buforowane krople ciśnieniem osmotycznym, które wynosiło 40 mOsm/l i w trakcie przechowywania ulegało systematycznemu wzrostowi. W 30 dniu analizy ciśnienie osmotyczne 1% roztworu wodnego przechowywanego w temperaturze 4°C wynosiło 45 mOsm/l, natomiast przechowywanego w temperaturze 20°C wynosiło 52 mOsm/l.

Ciśnienie osmotyczne 5% kropli w dniu sporządzenia charakteryzowało się znacznie wyższymi wartościami w porównaniu z 1% kroplami. Ciśnienie osmotyczne mieściło się w granicach od 475 mOsm/l (wersja IR) do 521 mOsm/l (wersja IVR). W trakcie 30 dni przechowywania w obu warunkach temperaturowych ciśnienie osmotyczne kropli wzrastało, by w 30 dniu analizy osiągnąć wartości: dla temperatury przechowywania 4°C: od 483 mOsm/l (wersja IR) do 534 mOsm/l (wersja IVR), dla temperatury przechowywania 20°C: od 521 mOsm/l (wersja IR) do 592 mOsm/l

(wersja IVR). 5% wodny roztwór ceftazydymu w porównaniu z 1% roztworem analogicznie charakteryzował się wyższym ciśnieniem osmotycznym, które bezpośrednio po sporządzeniu wynosiło 197 mOsm/l. W trakcie przechowywania w temperaturze 4°C ciśnienie osmotyczne 5% roztworu wodnego nieznacznie obniżyło się do wartości 193 mOsm/l, natomiast w trakcie przechowywania w temperaturze 20°C uległo znacznemu wzrostowi do wartości 230 mOsm/l. Oprócz pojedynczego i nieznacznego obniżenia ciśnienia osmotycznego dla 5% roztworu wodnego ceftazydymu przechowywanego w temperaturze 4°C (obniżenie wartości o 4 mOsm/l), we wszystkich pozostałych przypadkach zaobserwowano wzrost ciśnienia osmotycznego, intensywniejszy dla roztworów i kropli o stężeniu 5% oraz przechowywanych w temperaturze 20°C.

Wzrost ciśnienia osmotycznego spowodowany jest zwiększeniem stężenia cząsteczek lub jonów w roztworze. W przypadku analizowanych roztworów wodnych i kropli z ceftazydymem odzwierciedla on degradację ceftazydymu, polegającą przede wszystkim na hydrolizie ugrupowania β -laktamowego, odłączeniu pirydyny i powstaniu pochodnej metylidenu ceftazydymu. Największe zmiany ciśnienia osmotycznego zaobserwowano dla kropli o zwiększonej lepkości i konserwowanych (wersje 4R i IVR). Późniejsza analiza HPLC zawartości ceftazydymu w kroplach do oczu potwierdziła także najmniejszą trwałość chemiczną tych wersji, dla których notowano największy wzrost ciśnienia osmotycznego.

Wyniki przeprowadzonych oznaczeń ciśnienia osmotycznego potwierdzają konieczność buforowania kropli do oczu z ceftazydymem. 1% oraz 5% roztwory wodne ceftazydymu nie spełniają wymagań Farmakopei Polskiej VII i Farmakopei Europejskiej 6.0 pod względem ciśnienia osmotycznego. W niniejszej pracy zastosowano bufony cytrynianowe: bufor cytrynianowy I oraz dwukrotnie stężony bufor cytrynianowy II, przeznaczony do sporządzania wersji kropli o zwiększonej lepkości. Składy obu buforów (tabela 1) były takie same dla 1% i dla 5% wersji kropli. Spowodowało to uzyskanie ciśnienia hiperosmotycznego w przypadku 5% wersji kropli. Decyzja o zastosowaniu takich samych buforów dla 1% i 5% kropli podyktowana została wynikami wstępnych, nie zamieszczonych w niniejszej pracy badań, dotyczących między innymi doboru buforów dla kropli z ceftazydymem. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że zastosowanie buforów cytrynianowych o dwukrotnie niższym stężeniu niż zastosowane w niniejszej pracy gwarantowały 5% kroplom izoosmotyczność z płynem łzowym, jednakże takie rozcieńczenie buforów powodowało obniżenie ich właściwości

buforujących: w trakcie przechowywania 5% kropli sporządzonych z użyciem rozcieńczonych buforów obserwowano znaczne zmiany fizyczne kropli (pH, ciśnienia osmotycznego, zabarwienia), świadczące o szybkim rozkładzie antybiotyku. Zastosowane w niniejszej pracy bufory cytrynianowe gwarantują zgodne z wymaganiami farmakopealnymi ciśnienie osmotyczne kropli (dozwolone jest stosowanie kropli hiperosmotycznych) bezpośrednio po sporządzeniu oraz w okresie ich trwałości chemicznej. Wyniki badań ciśnienia osmotycznego wodnych roztworów oraz kropli recepturowych z ceftazydymem przedstawiono w tabelach 21 i 22.

Lepkość kropli do oczu z ceftazydymem oznaczana była w przypadku wersji, zawierających w składzie alkohol poliwinylowy, czyli wersji 3R i 4R oraz IIIR i IVR. Lepkość wyznaczano w dniu sporządzenia oraz w 30 dniu przechowywania kropli (tabela 25). Lepkość 1% kropli w dniu sporządzenia wynosiła: 7,82 mPa·s dla wersji 3R i 7,48 mPa·s dla wersji 4R. Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C nie uległa zmianie, natomiast po 30 dniach przechowywania w temperaturze 20°C wynosiła odpowiednio: 7,82 mPa·s dla wersji 3R i 7,50 mPa·s dla wersji 4R. Lepkość 5% kropli w dniu sporządzenia wynosiła: 7,70 mPa·s w przypadku wersji IIIR i 7,57 mPa·s w przypadku wersji IVR. Podczas 30 dni przechowywania w temperaturze 4°C lepkość nie uległa zmianie, natomiast po 30 dniach przechowywania w temperaturze 20°C wynosiła odpowiednio: 7,71 mPa·s dla wersji IIIR i 7,59 mPa·s dla wersji IVR. Niewielkie zmiany lepkości, jakie odnotowano w kroplach do oczu z ceftazydymem pozwalają na wyciągnięcie wniosku, że zmiany zachodzące w kroplach w trakcie ich przechowywania nie powodują zmian właściwości poliwinylalkoholu, który utrzymuje lepkość kropli na praktycznie niezmiennym poziomie.

Ocena organoleptyczna. W ramach oceny organoleptycznej określano przezroczystość, zabarwienie oraz zapach roztworów i kropli. Bezpośrednio po sporządzeniu wszystkie wersje 1% kropli były bezbarwne i takie pozostały przez cały okres przechowywania w temperaturze 4°C. 5% wersje kropli po sporządzeniu miały barwę słomkową, która podczas przechowywania pogłębiała się, intensywniej w temperaturze 20°C. Zmiany zabarwienia zachodziły bardziej dynamicznie w roztworach wodnych antybiotyku niż w buforowanych kroplach. 1% i 5% roztwory wodne oraz krople do oczu z ceftazydymem pozostały przezroczyste przez cały okres przechowywania. Wszystkie wersje kropli konserwowanych miały charakterystyczny zapach pochodzący od alkoholu β -fenyloetylowego. W trakcie przechowywania pojawiał się stopniowo zapach

produktu rozkładu ceftazydymu – pirydyny, intensywniej w temperaturze przechowywania 20°C. Zaobserwowane zmiany organoleptyczne: zabarwienia oraz zapachu – świadczyły o postępującym rozkładzie antybiotyku, znacznie bardziej intensywnym w temperaturze przechowywania 20°C.

Zmiany zawartości ceftazydymu w roztworach wodnych i kroplach

Trwałość chemiczna roztworów wodnych i kropli do oczu z ceftazydymem oznaczana była metodą HPLC. Za granicę trwałości przyjęto czas [ilość dni], w którym zawartość ceftazydymu w kroplach chronionych przed światłem utrzymywała się na poziomie nie niższym niż 90% zawartości początkowej. Za zawartość początkową (zawartość 100%) przyjęto stężenie ceftazydymu w roztworach wodnych i kroplach bezpośrednio po sporządzeniu.

Głównym czynnikiem decydującym o trwałości ceftazydymu w roztworach wodnych i kroplach do oczu była temperatura przechowywania. Krople nie mogą być przechowywane w temperaturze 20°C, ponieważ nie spełniają założeń niniejszej pracy: dla żadnej wersji 1% ani 5% kropli ich trwałość nie przekroczyła 3 dni. Analiza kropli przechowywanych w temperaturze 20°C prowadzona była jedynie w celach porównawczych oraz w celu obserwacji „przyspieszonego” rozkładu kropli, co dodatkowo umożliwiło oznaczenie stężenia produktu rozkładu ceftazydymu – pirydyny. Wyniki analizy trwałości kropli przechowywanych w temperaturze 4°C spełniły założenia pracy i potwierdziły słuszność przechowywania kropli w tych warunkach temperaturowych. Najwyższą trwałością chemiczną charakteryzowały się roztwory wodne oraz krople buforowane, bez dodatku alkoholu poliwinylowego oraz środków konserwujących. Z uwagi na fakt, że 1% i 5% roztwory wodne ceftazydymu nie spełniają jednego z podstawowych wymagań jakościowych dla kropli do oczu, dotyczącego ciśnienia osmotycznego - nie mogą być stosowane w terapii, pomimo ich znacznej trwałości chemicznej, wynoszącej dla 1% oraz 5% kropli odpowiednio: 27 dni oraz 18 dni. Trwałość kropli buforowanych, nie zawierających alkoholu poliwinylowego i środków konserwujących była identyczna jak trwałość roztworów wodnych o tym samym stężeniu: wynosiła dla wersji 1R oraz IR odpowiednio: 27 dni oraz 18 dni. Zarówno dla roztworów wodnych jak i dla kropli - trwałość wszystkich 1% wersji była wyższa niż trwałość odpowiadających im 5% wersji. Zaobserwowano również, że obecność w składzie kropli alkoholu poliwinylowego oraz środków konserwujących skutkowało obniżeniem ich trwałości: trwałość 1% kropli wynosiła: dla konserwowanej wersji 2R – 24 dni,

dla wersji o zwiększonej lepkości: 3R i 4R – 18 dni. Trwałość pozostałych wersji 5% kropli wynosiła: dla wersji IIR – 18 dni, dla wersji IIR – 15 dni, dla najbardziej złożonej wersji IVR - 12 dni. Wyniki przedstawiono w tabelach 40 – 49 oraz na rycinach 42 – 45.

Pomimo notowanego obniżenia trwałości kropli, szczególnie przez alkohol poliwinylowy, wszystkie wersje 1% i 5% kropli do oczu spełniły założenia niniejszej pracy pod względem trwałości chemicznej. Przechowywane w temperaturze 4°C powinny z powodzeniem umożliwić przeprowadzenie pełnej miejscowej antybiotykoterapii w przypadku infekcji narządu wzroku.

❖ **Trwałość chemiczna a aktywność przeciwdrobnoustrojowa kropli z ceftazydymem**

Ponieważ mechanizm rozkładu ceftazydymu polega na odłączeniu pirydyny z jednoczesnym otwarciem pierścienia β -laktamowego – dochodzi do utraty aktywności przeciwdrobnoustrojowej przez ten antybiotyk. Porównując jednak wyniki badań trwałości chemicznej 1% kropli z wynikami badań ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej [139], zaobserwowano znaczące różnice. Dla kropli przechowywanych w temperaturze 4°C obniżenie zawartości ceftazydymu o 10% następowało po 18 – 27 dniach, w zależności od wersji recepturowej (tabele 41 – 44). Natomiast wyniki badań Kodym i wsp. [139] wykazały brak zmian aktywności przeciwdrobnoustrojowej kropli, która pozostawała na niezmiennym, 100% poziomie przez 30 dni, czyli przez cały okres przechowywania w temperaturze 4°C. Również w przypadku kropli przechowywanych w temperaturze 20°C, ich trwałość w aspekcie aktywności przeciwdrobnoustrojowej była znacznie wyższa niż wyznaczona w niniejszej pracy trwałość chemiczna. Taka rozbieżność wyników może mieć dwojaką przyczynę. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa kropli określona została metodą cylinderkowo-płytkową, poprzez pomiary średnicy stref zahamowania wzrostu. Strefa zahamowania wzrostu nie jest proporcjonalna do stężenia, lecz do logarytmu ze stężenia antybiotyku [18], dlatego wyniki obu oznaczeń nie pokrywają się. Ponadto analiza trwałości mikrobiologicznej oraz trwałości chemicznej (HPLC) prowadzone były odrębnie a metody nie zostały zwalidowane równocześnie pod kątem przeliczenia: aktywność-zawartość antybiotyku. Z tego względu nie można jednoznacznie porównywać wyników badań przeprowadzonych obiema metodami. W przypadku konieczności jednoczesnego określenia trwałości chemicznej i mikrobiologicznej, należałoby przeprowadzić jednoczesną wstępną walidację porównawczą a następnie równoczesną analizę obiema metodami.

5. Technologia i trwałość 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”

Ze względu na niską trwałość ceftazydymu w roztworach wodnych, nie jest możliwa produkcja przemysłowej postaci leku do stosowania miejscowego z ceftazydymem w postaci tradycyjnych kropli do oczu. Dla handlowej wersji kropli z ceftazydymem założono w niniejszych badaniach zastosowanie technologii dwukomorowej. Technologia dwukomorowa polega na rozdzieleniu antybiotyku od rozpuszczalnika: w jednej z komór umieszczony jest suchy, liofilizowany antybiotyk, w drugiej jałowy rozpuszczalnik. Zawartość obu komór łączona byłaby przez pacjenta przed pierwszą aplikacją kropli. Przy zastosowaniu takiej technologii konieczne stało się określenie:

- ✓ trwałości kropli w opakowaniu dwukomorowym przed połączeniem zawartości komór, czyli osobno trwałości antybiotyku oraz trwałości rozpuszczalnika,
- ✓ trwałości kropli od momentu połączenia antybiotyku z rozpuszczalnikiem, czyli trwałości kropli - roztworu.

Rozpuszczalniki do kropli „przemysłowych”

Z oceny fizykochemicznej 1% i 5% recepturowych kropli do oczu z ceftazydymem, przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C wynika, że wszystkie zaprogramowane do badań recepturowe wersje kropli spełniają założenia niniejszej pracy, czyli pozwalają na przeprowadzenie pełnej antybiotykoterapii w miejscowym leczeniu infekcji narządu wzroku. Pomimo obniżania trwałości kropli z ceftazydymem przez alkohol poliwinylowy oraz zastosowane środki konserwujące - trwałość kropli recepturowych, w zależności od wersji wynosiła 12 - 27 dni. W oparciu o wyniki analizy trwałości kropli w wersjach recepturowych - jako rozpuszczalniki dla wersji „przemysłowych” zastosowano w niniejszej pracy placebo wersji recepturowych. Składy rozpuszczalników podano w tabeli 7, natomiast sposób sporządzania przedstawiono w punkcie 6.2.

Po połączeniu antybiotyku z rozpuszczalnikiem, w zależności od wersji rozpuszczalnika, otrzymuje się krople w postaci roztworu (wersje P) o składzie identycznym ze składem kropli odpowiedniej wersji recepturowej (wersje R).

Zastosowanie opakowania dwukomorowego umożliwia sporządzenie kropli gotowych do aplikacji w bardzo krótkim czasie, potrzebnym jedynie na połączenie obu komór i wymieszanie składników. Tak znaczne skrócenie czasu sporządzania kropli możliwe jest dzięki bardzo dobrej rozpuszczalności ceftazydymu w zastosowanych w badaniach rozpuszczalnikach. W technologii kropli „przemysłowych” pominięte także zostały czasochłonne i wymagające specjalistycznej aparatury etapy sporządzania kropli recepturowych. Wyeliminowano konieczność przygotowania roztworów substancji pomocniczych, takich jak bufony cytrynianowe, roztwór poliwinylalkoholu czy roztwór boranu fenylortęciowego. Wyeliminowano również osobny etap konserwowania kropli a także etap sączenia mikrobiologicznego, ponieważ wszystkie składniki są jałowe.

Możliwość sporządzania kropli do oczu z ceftazydymem w tak krótkim czasie jest dużym ułatwieniem technologicznym, ale ma także ogromne znaczenie terapeutyczne, ponieważ w przypadku zakażeń narządu wzroku, szczególnie tak niebezpiecznym dla oka patogenem jak pałeczka ropy błękitnej, ważne jest jak najszybsze rozpoczęcie kuracji.

❖ **Trwałość kropli „przemysłowych” przed połączeniem zawartości komór**

✓ **Trwałość antybiotyku**

Preparaty ceftazydymu w postaci suchej wykazują znaczną trwałość. Chronione przed światłem mogą być przechowywane w temperaturze pokojowej; w przypadku preparatu Biotum producent deklaruje okres trwałości: dwa lata [111, 112].

✓ **Trwałość rozpuszczalników**

Rozpuszczalniki „przemysłowe” (skład – tabela 7) poddano ocenie fizycznej, obejmującej pomiar pH, ciśnienia osmotycznego oraz lepkości w przypadku rozpuszczalników zawierających alkohol poliwinylowy – bezpośrednio po sporządzeniu oraz w trakcie przechowywania. Warunki i czas przechowywania rozpuszczalników „przemysłowych” zgodne były z wytycznymi ICH, dotyczącymi badania stabilności nowych substancji i produktów leczniczych: Q1A(R2) [157]. Badania stabilności rozpuszczalników prowadzone były przez okres 12 miesięcy w warunkach badań długoterminowych (temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, wilgotność względna $60\% \pm 5\%$) oraz przez okres 6 miesięcy w warunkach przyspieszonego starzenia (temperatura $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,

wilgotność względna $75\% \pm 5\%$). Celem badań długoterminowych było określenie warunków przechowywania rozpuszczalników. Badania w warunkach przyspieszonych umożliwiły ocenę wpływu wyższych temperatur na zmiany właściwości fizycznych rozpuszczalników, a także określenie wpływu „zestarzonych” rozpuszczalników na trwałość sporządzonych z ich użyciem kropli z ceftazydymem (badania trwałości kropli „przemysłowych”).

❖ **Badania długoterminowe ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $60\% \pm 5\% \text{ RH}$)**

W trakcie przechowywania rozpuszczalników „przemysłowych” w warunkach badań długoterminowych, w odstępach trzymiesięcznych prowadzono ocenę fizyczną, która obejmowała pomiar pH, ciśnienia osmotycznego oraz lepkości w przypadku rozpuszczalników zawierających w składzie alkohol poliwinylowy. Szczegółową ocenę przedstawiono w tabelach 8 i 9. Po 12 miesiącach przechowywania zaobserwowano niewielkie zmiany parametrów fizycznych.

Bezpośrednio po sporządzeniu i wyjałowieniu **pH** rozpuszczalników dla 1% kropli mieściło się w granicach od 6,13 (wersja 3) do 6,26 (wersja 2), natomiast dla 5% kropli w granicach od 6,13 (wersje III i IV) do 6,28 (wersja II). Po 12 miesiącach przechowywania w temperaturze $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pH rozpuszczalników nieznacznie obniżyło się: dla 1% kropli mieściło się w granicach od 5,95 (wersja 3) do 6,18 (wersja 2), dla 5% kropli w granicach od 5,95 (wersja III) do 6,14 (wersje I i II).

Bezpośrednio po sporządzeniu i wyjałowieniu **ciśnienie osmotyczne** rozpuszczalników dla 1% kropli wynosiło od 300 mOsm/l (wersja 1) do 367 mOsm/l (wersja 4), natomiast dla 5% kropli - od 300 mOsm/l (wersja I) do 368 mOsm/l (wersja IV). Po 12 miesiącach przechowywania w temperaturze $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ciśnienie osmotyczne rozpuszczalników nieznacznie wzrosło: dla 1% kropli mieściło się w granicach od 311 mOsm/l (wersja 1) do 380 mOsm/l (wersja 4), dla 5% kropli mieściło się w granicach od 311 mOsm/l (wersja I) do 382 mOsm/l (wersja IV).

Lepkość rozpuszczalników w dniu sporządzenia i wyjałowienia wynosiła: 7,88 mPa·s i 7,47 mPa·s (odpowiednio dla wersji 3 i 4) oraz 7,88 mPa·s i 7,56 mPa·s (odpowiednio dla wersji III i IV). Po 12 miesiącach przechowywania w temperaturze

25°C ± 2°C lepkość rozpuszczalników osiągnęła wartości: 8,79 mPa·s i 8,53 mPa·s (odpowiednio dla wersji 3 i 4) oraz 8,79 mPa·s i 8,57 mPa·s (dla wersji III i IV).

Prowadzono również ocenę organoleptyczną, która nie wykazała żadnych zmian zabarwienia ani utraty przezroczystości rozpuszczalników podczas 12 miesięcy przechowywania w temperaturze 25°C ± 2°C. Dla wszystkich wersji rozpuszczalników zawierających środki konserwujące utrzymywał się charakterystyczny zapach alkoholu β-feniloetylowego.

Test konserwacji

Zgodnie z wymaganiami Farmakopei Polskiej VII i Farmakopei Europejskiej 6.0 w przypadku kropli do oczu zawierających środek konserwujący należy potwierdzić jego skuteczność przeciwdrobnoustrojową przez cały okres stosowania preparatu. Badanie skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej zostało wykonane w Katedrze i Zakładzie Bakteriologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu dla rozpuszczalników „przemysłowych”, przechowywanych przez okres 12 miesięcy w warunkach badań długoterminowych (temperatura 25°C ± 2°C, wilgotność względna 60% ± 5%). Badanie przeprowadzono w oparciu o szczepy drobnoustrojów testowych wymienione w monografii 5.1.3. Farmakopei Polskiej VII oraz dwa dodatkowe, pozafarmakopealne drobnoustroje: *Listeria monocytogenes* i *Bacillus cereus*. Przeprowadzone oznaczenie wykazało, że boran fenylortęciowy w połączeniu z alkoholem β-feniloetylowym w zastosowanych stężeniach po 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 25°C ± 2°C spełniają wymagania w zakresie skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej w stosunku do szczepów bakterii podanych w FP VII oraz w stosunku do dodatkowego szczepu testowego *Listeria monocytogenes*. Po 28 dniach odnotowano również wysoki stopień redukcji komórek szczepów testowych *Bacillus cereus*, jednak nie osiągnięto wymaganej przez FP VII 100% redukcji (tabele 12 i 13).

Zarówno wyniki badania skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej zastosowanych w rozpuszczalnikach środków konserwujących jaki i wyniki oceny fizycznej rozpuszczalników – po 12 miesiącach przechowywania w warunkach testów długoterminowych - potwierdziły możliwość przechowywania rozpuszczalników dla kropli przemysłowych w temperaturze do 25°C. Ponieważ ceftazydym w postaci suchej

jest trwały w temperaturze 25°C (trwałość preparatu Biotum wynosi 2 lata) – powyższe badania mogłyby stać się podstawą do rejestracji produktu leczniczego - kropli do oczu z cefazydymem w opakowaniu dwukomorowym z rocznym okresem ważności preparatu w tych warunkach temperaturowych.

❖ **Badania przyspieszone (40°C ± 2°C, 75% ± 5% RH)**

W przypadku badań rozpuszczalników „przemysłowych” w warunkach przyspieszonych, ocenę fizyczną przeprowadzono bezpośrednio po sporządzeniu oraz po 3 i po 6 miesiącach przechowywania rozpuszczalników. Analogicznie jak w przypadku badań w warunkach długoterminowych, oznaczono pH, ciśnienie osmotyczne oraz lepkość w przypadku rozpuszczalników dla wersji kropli o zwiększonej lepkości. Szczegółową ocenę przedstawiono w tabeli 10. Po 6 miesiącach przechowywania pH rozpuszczalników nieznacznie obniżyło się, natomiast ciśnienie osmotyczne wzrosło. Odnotowano również wzrost lepkości dla wersji zawierających w składzie alkohol poliwinylowy. Przechowywanie rozpuszczalników przez okres 6 miesięcy w 40°C nie spowodowało żadnej zauważalnej zmiany w zabarwieniu i przezroczystości ani zmiany zapachu.

Dla obu warunków przechowywania (badania długoterminowe i przyspieszone) pH rozpuszczalników ulegało obniżeniu, jednak w rozpuszczalnikach poddanych działaniu temperatury 40°C przez okres 6 miesięcy zmiany te były bardziej widoczne niż w rozpuszczalnikach, objętych testem długoterminowym, pomimo dwukrotnie krótszego okresu przechowywania. Dla obu warunków temperaturowych wzrost ciśnienia osmotycznego był zbliżony. Dla każdej wersji zawierającej alkohol poliwinylowy zaobserwowano zwiększenie lepkości, bardziej intensywne dla testu długoterminowego. Na podstawie powyższych danych można wywnioskować, że zmiana pH w rozpuszczalnikach zależy przede wszystkim od temperatury przechowywania, natomiast wzrost lepkości - od czasu przechowywania rozpuszczalników. Wyniki oceny jakościowej rozpuszczalników w trakcie przechowywania przedstawiono w tabelach 8, 9 i 10.

❖ Trwałość kropli „przemysłowych” wykonanych na bazie świeżo sporządzonych rozpuszczalników

Pierwszy etap badań trwałości kropli „przemysłowych” stanowiła ocena trwałości 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem, wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników „przemysłowych”, które przygotowano zgodnie z opisem zamieszczonym w punkcie 9.2. Wykonanie kropli polegało na rozpuszczeniu w warunkach aseptycznych ceftazydymu w jałowych rozpuszczalnikach „przemysłowych”, czyli metoda sporządzania odpowiadała założeniu technologii dwukomorowej dla handlowej postaci leku. Każda z wersji kropli „przemysłowych” została rozdzielona na dwie serie, które były analizowane osobno. Krople przechowywano w chłodziarkach farmaceutycznych w temperaturze 4°C przez okres 30 dni. Wyniki przeprowadzonych uprzednio badań trwałości kropli recepturowych jednoznacznie wskazują, że aby krople z ceftazydymem spełniały założenia niniejszej pracy odnośnie trwałości chemicznej, powinny być przechowywane w temperaturze 4°C. Przechowywanie w temperaturze 20°C powoduje bardzo szybki rozkład antybiotyku, z tego względu w badaniach wersji „przemysłowych” pominięto już te warunki temperaturowe i krople przechowywano tylko w temperaturze 4°C. Bezpośrednio po sporządzeniu oraz w trakcie przechowywania w temperaturze 4°C, w odstępach trzydniowych, dokonywano oceny jakościowej kropli, w ramach której oznaczano, analogicznie jak dla wersji recepturowych: pH, ciśnienie osmotyczne, zabarwienie i przezroczystość oraz prowadzono analizę zmian zawartości ceftazydymu za pomocą metody HPLC. Ponadto w wersjach zawierających w składzie alkohol poliwinylowy oznaczano lepkość.

pH 1% kropli „przemysłowych” sporządzonych na bazie świeżo wykonanych rozpuszczalników wynosiło w dniu sporządzenia od 6,20 (wersja 4P0) do 6,30 (wersja 1P0). Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C pH kropli nieznacznie obniżyło się do wartości: od 6,17 (wersja 4P0) do 6,27 (wersja 1P0). pH 5% kropli „przemysłowych” sporządzonych na bazie świeżo wykonanych rozpuszczalników w dniu sporządzenia mieściło się w granicach od 6,39 (wersja IIP0) do 6,56 (wersja IIIP0). Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C pH również obniżyło się i wynosiło: od 6,33 (wersja IVP0) do 6,41 (wersja IIIP0). Wyniki oznaczeń pH przedstawiono w tabeli 19.

Ciśnienie osmotyczne 1% kropli „przemysłowych” sporządzonych z użyciem świeżo wykonanych rozpuszczalników wynosiło w dniu sporządzenia od 326 mOsm/l (wersja 3P0) do 380 mOsm/l (wersja 4P0). Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C ciśnienie osmotyczne nieznacznie wzrosło do wartości: od 329 mOsm/l (wersje 1P0 i 3P0) do 391 mOsm/l (wersja 4P0). Ciśnienie osmotyczne 5% kropli „przemysłowych” sporządzonych na bazie świeżo wykonanych rozpuszczalników w dniu sporządzenia mieściło się w granicach od 470 mOsm/l (wersja IP0) do 520 mOsm/l (wersja IVP0). Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C ciśnienie osmotyczne wzrosło do wartości: od 474 mOsm/l (wersja IP0) do 532 mOsm/l (wersja IVP0). Wyniki oznaczeń ciśnienia osmotycznego przedstawiono w tabeli 23.

Lepkość 1% kropli, sporządzonych na bazie świeżo wykonanych rozpuszczalników w dniu sporządzenia wynosiła dla wersji 3P0 i 4P0 odpowiednio: 7,80 mPa·s i 7,52 mPa·s, po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C praktycznie nie zmieniła się i wynosiła odpowiednio: 7,82 mPa·s i 7,52 mPa·s. Lepkość 5% kropli wersji IIIPO i IVP0 w dniu sporządzenia wynosiła odpowiednio: 7,67 mPa·s i 7,48 mPa·s, po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C również uległa nieistotnym zmianom i wynosiła: 7,67 mPa·s i 7,45 mPa·s. Wyniki oznaczenia lepkości kropli zestawiono w tabeli 26.

Ocena organoleptyczna. W ramach oceny organoleptycznej określano przezroczystość, zabarwienie oraz zapach kropli. Bezpośrednio po sporządzeniu wszystkie wersje 1% kropli „przemysłowych” były bezbarwne i takie pozostały przez cały okres przechowywania w temperaturze 4°C. 5% wersje kropli „przemysłowych” po sporządzeniu miały barwę słomkową, która podczas przechowywania stopniowo pogłębiała się aż do barwy jasnożółtej. Wszystkie wersje kropli konserwowanych miały charakterystyczny zapach pochodzący od alkoholu β -fenyloetylowego. W trakcie przechowywania pojawiał się stopniowo zapach produktu rozkładu ceftazydymu - pirydyny. Wszystkie wersje kropli pozostały przezroczyste przez cały okres przechowywania.

Trwałość ceftazydymu w 1% i 5% kroplach do oczu otrzymanych przez rozpuszczenie antybiotyku w świeżo sporządzonym rozpuszczalniku „przemysłowym” określono analogicznie jak w przypadku kropli recepturowych, metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Trwałość wszystkich 1% wersji była wyższa

niż trwałość odpowiadających im 5% wersji kropli. Trwałość kropli o niemodyfikowanej lepkości w przypadku 1% kropli (wersje 1P0 i 2P0) wynosiła 24 dni, w przypadku 5% kropli (wersje IP0 i IIP0) wynosiła 18 dni. Obecność w składzie kropli alkoholu poliwinylowego spowodowało obniżenie ich trwałości: dla 1% kropli wersji 3P0 i 4P0 zawartość ceftazydymu na poziomie powyżej 90% zawartości wyjściowej utrzymywała się przez 21 dni. W przypadku 5% kropli o zwiększonej lepkości trwałość wyniosła dla wersji IIP0 – 18 dni, natomiast dla wersji IVP0 – 15 dni.

Wyniki oznaczeń podano w tabelach 50 – 53 oraz na rycinach 46 i 48.

❖ **Porównanie trwałości kropli „przemysłowych” wykonanych z użyciem rozpuszczalnika świeżo sporządzonego z kroplami recepturowymi**

Zmiany pH po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C kropli recepturowych oraz kropli „przemysłowych”, wykonanych na bazie świeżego rozpuszczalnika były porównywalne. W obu przypadkach odnotowano obniżenie pH podczas przechowywania, jednak zmiany te były niewielkie. Największa zmiana³ pH dla kropli recepturowych wyniosła -0,08 pH dla wersji IR i IVR, natomiast dla kropli „przemysłowych”: -0,15 pH dla wersji IIP0.

Zmiany ciśnienia osmotycznego po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C kropli recepturowych oraz kropli „przemysłowych”, wykonanych na bazie świeżego rozpuszczalnika były porównywalne. W obu przypadkach odnotowano wzrost ciśnienia osmotycznego, co można tłumaczyć pojawianiem się produktów rozkładu antybiotyku w kroplach. Największy wzrost ciśnienia osmotycznego dla kropli recepturowych wyniósł: +13 mOsm/l dla wersji IVR, natomiast dla kropli „przemysłowych”: +12 mOsm/l dla wersji 2P0 i IVP0.

Zmiany **lepkości** podczas przechowywania w temperaturze 4°C były nieistotne zarówno w przypadku kropli recepturowych jak i „przemysłowych”. W obu przypadkach krople przez cały okres przechowywania pozostały przezroczyste, natomiast zmiany barwy i zapachu odpowiadających sobie wersji były zbliżone.

³ Zmiany wartości parametrów oceny fizycznej podano jako „-” (spadek wartości) lub „+” (wzrost wartości)

Zmiany **zawartości ceftazydymu** w kroplach recepturowych i „przemysłowych”, wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników były zbliżone. Trwałość kropli recepturowych, w zależności od wersji, wynosiła 27 - 12 dni, kropli „przemysłowych” 24 - 15 dni. Dla wersji „przemysłowych” o zwiększonej lepkości zaobserwowano większą o 3 dni trwałość w porównaniu z odpowiadającymi im wersjami kropli recepturowych. Porównanie trwałości wersji recepturowych i „przemysłowych”, wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników, przedstawiono w zbiorczej tabeli 67.

❖ **Trwałość kropli „przemysłowych” wykonanych z użyciem rozpuszczalników, poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia**

Kolejnym etapem badań, dotyczących trwałości kropli „przemysłowych”, było określenie wpływu zmian zachodzących w rozpuszczalnikach „przemysłowych” podczas ich przechowywania na trwałość sporządzonych z ich użyciem kropli do oczu z ceftazydymem. Do tego etapu badań wybrano rozpuszczalniki przechowywane uprzednio w temperaturze 40°C, ponieważ większe zmiany właściwości fizycznych odnotowano dla rozpuszczalników przechowywanych w warunkach testów przyspieszonych niż testów długoterminowych. Wybór ten oparto na założeniu, że jeżeli zmiany, jakie zaszły w trakcie przechowywania rozpuszczalników będą miały istotny wpływ na trwałość kropli, to wpływ ten będzie bardziej uwypuklony, gdy krople zostaną sporządzone z użyciem rozpuszczalników, w których zaszły większe zmiany podczas przechowywania.

Krople do badań sporządzono z użyciem rozpuszczalników poddanych uprzednio 6-miesięcznemu testowi przyspieszonego starzenia (40°C ± 2°C; 75% RH ± 5% RH) według składów podanych w tabeli 16, zgodnie z opisem wykonania przedstawionym w punkcie 9.2. Trwałość fizykochemiczna kropli określana była analogicznie jak trwałość kropli, wykonanych na bazie świeżo sporządzonych rozpuszczalników. Krople umieszczono w chłodziarkach farmaceutycznych w temperaturze 4°C bez dostępu światła na okres 30 dni. Bezpośrednio po sporządzeniu a następnie w odstępach trzydniowych dokonywano ich oceny organoleptycznej i fizycznej, obejmującej pomiar pH, ciśnienia osmotycznego oraz lepkości w przypadku kropli zawierających w składzie alkohol poliwinylowy. Za pomocą metody HPLC prowadzono analizę zmian zawartości ceftazydymu w kroplach.

pH 1% kropli „przemysłowych” sporządzonych z użyciem rozpuszczalników, poddanych uprzednio 6-miesięcznemu testowi przyspieszonego starzenia, w dniu sporządzenia mieściło się w granicach od 6,04 (wersja 4P6) do 6,20 (wersja 1P6). Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C pH kropli nieznacznie obniżyło się do wartości: od 6,01 (wersja 3P6) do 6,18 (wersja 1P6). pH 5% kropli „przemysłowych” wynosiło w dniu sporządzenia od 6,19 (wersja IIP6) do 6,31 (wersja IIIP6). Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C pH uległo nieznacznie obniżeniu i mieściło się w granicach: od 6,11 (wersja IVP6) do 6,20 (wersja IP6). Wyniki oznaczeń pH przedstawiono w tabeli 20.

Ciśnienie osmotyczne 1% kropli „przemysłowych”, sporządzonych na bazie rozpuszczalników poddanych uprzednio 6-miesięcznemu testowi przyspieszonego starzenia, wynosiło w dniu sporządzenia od 331 mOsm/l (wersja 1P6) do 396 mOsm/l (wersja 4P6). Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C ciśnienie osmotyczne nieznacznie wzrosło do wartości: od 335 mOsm/l (wersja 1P6) do 404 mOsm/l (wersja 4P6). Analogicznie ciśnienie osmotyczne 5% kropli „przemysłowych” w dniu sporządzenia wynosiło od 479 mOsm/l (wersja IP6) do 542 mOsm/l (wersja IVP6). Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C ciśnienie osmotyczne wzrosło do wartości: od 483 mOsm/l (wersja IP6) do 555 mOsm/l (wersja IVP6). Wyniki oznaczeń ciśnienia osmotycznego przedstawiono w tabeli 24.

Lepkość 1% kropli, sporządzonych z użyciem rozpuszczalników poddanych uprzednio 6-miesięcznemu testowi przyspieszonego starzenia w dniu sporządzenia wynosiła dla wersji 3P6 i 4P6 odpowiednio: 8,41 mPa·s i 8,28 mPa·s, po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C nieznacznie obniżyła się i wynosiła: 8,40 mPa·s i 8,26 mPa·s. Lepkość 5% kropli wersji IIIP6 i IVP6 w dniu sporządzenia wynosiła odpowiednio: 8,49 mPa·s i 8,29 mPa·s, po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C również uległa niewielkim zmianom i wynosiła: 8,46 mPa·s i 8,27 mPa·s. Wyniki pomiarów lepkości zestawiono w tabeli 27.

Ocena organoleptyczna. W ramach badań organoleptycznych dokonano oceny przezroczystości, zabarwienia oraz zapachu kropli. Bezpośrednio po sporządzeniu wszystkie wersje 1% kropli „przemysłowych” były bezbarwne i takie pozostały przez cały okres przechowywania w temperaturze 4°C. 5% wersje kropli „przemysłowych” po sporządzeniu miały barwę słomkową, która podczas przechowywania stopniowo

pogłębiała się aż do barwy jasnożółtej. Wszystkie wersje kropli konserwowanych miały charakterystyczny zapach pochodzący od alkoholu β -fenyloetylowego. W trakcie przechowywania pojawiał się stopniowo zapach produktu rozkładu ceftazydymu – pirydyny. Wszystkie wersje kropli pozostały przezroczyste przez cały okres przechowywania.

Trwałość ceftazydymu w 1% i 5% kroplach do oczu otrzymanych przez rozpuszczenie antybiotyku w rozpuszczalniku „przemysłowym”, który uprzednio został poddany testowi przyspieszonego starzenia, określono analogicznie jak w przypadku kropli recepturowych oraz kropli „przemysłowych”, wykonanych na świeżo sporządzonym rozpuszczalniku, za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Trwałość wszystkich 1% wersji była wyższa niż trwałość odpowiadających im 5% wersji kropli. Trwałość 1% kropli wersji 1P6, 2P6 i 4P6 wynosiła 24 dni, wersji 3P6 – 21 dni. W przypadku 5% kropli trwałość wersji niekonserwowanych: IP6 i IIP6 wynosiła 18 dni, pozostałych wersji: 21 dni (wersja IIP6) oraz 15 dni (wersja IVP6).

Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabelach 54 – 57 oraz na rycinach 47 i 49.

❖ **Porównanie trwałości kropli „przemysłowych” wykonanych z użyciem rozpuszczalnika poddanego 6-miesięcznemu testowi w warunkach przyspieszonego starzenia z kroplami wykonanymi z użyciem rozpuszczalnika świeżo sporządzonego**

Zmiany, jakie nastąpiły w rozpuszczalnikach „przemysłowych” podczas 6 miesięcy przechowywania w warunkach testów przyspieszonych (temperatura $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, wilgotność względna $75\% \pm 5\%$), nie wpłynęły w sposób istotny na właściwości fizyczne kropli sporządzonych z ich użyciem. Zmiany fizyczne, jakie zaobserwowano w kroplach sporządzonych na bazie obu rozpuszczalników (świeżo sporządzonych oraz poddanych testowi przyspieszonego starzenia) podczas przechowywania przez okres 30 dni w temperaturze 4°C były zbliżone. W obu przypadkach odnotowano obniżenie pH podczas przechowywania, jednak zmiany te były niewielkie. Największa zmiana pH dla kropli na bazie świeżo sporządzonego rozpuszczalnika wyniosła: $-0,15$ pH dla wersji IIP0, natomiast dla kropli na bazie „zestarzonego” rozpuszczalnika: $-0,17$ pH dla wersji IIP6 i IVP6.

W obu przypadkach odnotowano także podobny wzrost ciśnienia osmotycznego: największy dla kropli wykonanych z użyciem świeżo sporządzonego rozpuszczalnika: +12 mOsm/l dla wersji 2P0 i IVP0, dla kropli sporządzonych z użyciem rozpuszczalnika poddanego uprzednio testowi przyspieszonego starzenia: +13 mOsm/l dla wersji IVP6.

Nie zaobserwowano również istotnych zmian lepkości dla wersji zawierających alkohol poliwinylowy. Ponadto krople przez cały okres przechowywania pozostały przezroczyste, natomiast zmiany barwy i zapachu dla odpowiadających sobie wersji były zbliżone.

Zmiany **zawartości ceftazydymu** w kroplach „przemysłowych”, wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników oraz rozpuszczalników poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia były zbliżone. Porównanie trwałości wersji „przemysłowych” P0 i P6 przedstawiono w zbiorczej tabeli 67.

Tabela 67. Porównanie trwałości kropli z ceftazydymem w wersjach recepturowych R oraz „przemysłowych” P0 i P6

Okres trwałości kropli [dni], limitowany nie większym niż 10% rozkładem ceftazydymu dla temperatury przechowywania 4°C					
krople recepturowe R		krople „przemysłowe” P0 na bazie rozpuszczalnika świeżo sporządzonego		krople „przemysłowe” P6 na bazie rozpuszczalnika poddanego 6-miesięcznemu testowi przyspieszonego starzenia	
wersja	trwałość [dni]	wersja	trwałość [dni]	wersja	trwałość [dni]
1R	27	1P0	24	1P6	24
2R	24	2P0	24	2P6	24
3R	18	3P0	21	3P6	21
4R	18	4P0	21	4P6	24
IR	18	IP0	18	IP6	18
IIR	18	IIP0	18	IIP6	21
IIIR	15	IIIP0	18	IIIP6	18
IVR	12	IVP0	15	IVP6	15

6. Pirydyna – szkodliwy produkt rozkładu ceftazydymu

Mechanizm rozkładu ceftazydymu w roztworach wodnych jest wielokierunkowy, przy czym zawsze dochodzi do otwarcia pierścienia β -laktamowego z jednoczesnym odłączeniem cząsteczki pirydyny [115-120]. Zgodnie z Dyrektywą 67/548/EWG w sprawie klasyfikacji niebezpiecznych substancji chemicznych - pirydyna należy do grupy produktów szkodliwych – grupa Xn, R20/21/22 (wykazuje szkodliwe własności w przypadku połknięcia, inhalacji lub kontaktu ze skórą) [151]. Jest wymieniona również w wytycznych ICH Topic Q3C (R4): *Impurities: Guideline for Residual Solvents* jako rozpuszczalnik 2 klasy w produktach farmaceutycznych, dla których określone są maksymalne dopuszczalne dobowe limity ekspozycji (PDE) [162].

Obok szkodliwych działań ogólnych pirydyna podana do worka spojówkowego może wykazywać miejscową toksyczność w stosunku do tkanek oka. Z powyższych względów przy opracowaniu technologii kropli do oczu z ceftazydymem należało określić, czy pojawiające się w trakcie przechowywania kropli stężenia pirydyny:

1. nie przekraczają maksymalnych dopuszczalnych stężeń pirydyny w preparatach farmaceutycznych,
2. nie osiągają stężeń, które mogą powodować podrażnienie oka lub mogą wykazywać miejscową toksyczność w stosunku do tkanek oka.

Ad 1. Ponieważ nie istnieje handlowy preparat z ceftazydymem w postaci kropli do oczu, nie są określone również maksymalne dopuszczalne stężenia pirydyny jako produktu rozkładu ceftazydymu w tej postaci leku. W monografiach szczegółowych *Ceftazidime for Injection* (Ph.Eur 6.0, USP 29), czyli preparatów z ceftazydymem do przygotowania roztworów do iniekcji, określone są tylko maksymalne dopuszczalne limity pirydyny w suchej postaci leku do sporządzenia roztworu do podania pozajelitowego. Z tego powodu w niniejszej pracy skorzystano z danych, zawartych w wytycznych ICH Topic Q3C (R4), dotyczących rozpuszczalników stosowanych w produktach farmaceutycznych, zgodnie z którymi pirydyna, jako rozpuszczalnik 2 klasy, ma określony limit PDE (*Permitted Daily Exposure*), czyli limit maksymalnego dopuszczalnego dobowego spożycia (*the maximum acceptable intake per day*), wynoszący 2 mg na dobę.

Ad 2. W kontakcie ze skórą pirydyna powoduje ból i zaczerwienienie. Niewiele jest jednak danych literaturowych dotyczących konkretnych badań nad szkodliwością pirydyny przy narażeniu na jej działanie tkanek oka. Nawet w obszernym opracowaniu z 1992 roku: *Toxicological profile for pyridine* [148], autorzy odwołują się do wyników badań z 1951 roku [169]: po podaniu czystej pirydyny do oczu królików odnotowano efekty zmiennego podrażnienia ocenianego na 7 stopni w 10-stopniowej skali. Inne badania dowiodły, że po podaniu do oka królika pirydyny w stężeniu 63 mg/ml nie odnotowano okulistycznych efektów toksycznych [135]. W oparciu o masy molowe ceftazydymu⁴ i pirydyny⁵ przeliczono, że 63 mg pirydyny może powstać w wyniku rozkładu 435,33 mg ceftazydymu. W zastosowanych w niniejszych badaniach kroplach o oznaczonych stężeniach wyjściowych: 10 mg/ml oraz 50 mg/ml nie ma możliwości powstania pirydyny w stężeniu 63 mg/ml.

Ze względu jednak na określony limit PDE, czyli limit maksymalnego dopuszczalnego spożycia, wynoszący dla pirydyny 2 mg na dobę [162], należało sprawdzić, czy ilość powstającej pirydyny nie przekracza dopuszczalnego limitu w okresie trwałości leku, czyli w okresie, w którym zawartość ceftazydymu utrzymuje się na poziomie nie niższym niż 90% zawartości początkowej w kroplach.

Analiza pirydyny metodą HPLC była analizą dodatkową, prowadzoną równolegle z oznaczeniem ilościowym ceftazydymu w kroplach, w jednym nastrzyku na kolumnę. Parametry rozdziału oraz walidacja metody zostały omówione w punktach 12.1. i 12.4. Wyniki oznaczeń zawartości pirydyny w kroplach przedstawiono w tabelach 64 - 66. We wszystkich wersjach kropli, przechowywanych w temperaturze 4°C, zawartość pirydyny, zarówno w ostatnim dniu trwałości kropli, jak i w 30 dniu analizy była poniżej limitu oznaczalności pirydyny, czyli dla 1% kropli: poniżej stężenia 0,192 mg/ml, dla 5% kropli: poniżej stężenia 0,960 mg/ml. Można przyjąć, że w przypadku 1% kropli - w okresie trwałości kropli, limitowanym 10% spadkiem zawartości ceftazydymu, przy zwykle stosowanym dawkowaniu kropli, limit PDE dla pirydyny nie powinien zostać przekroczony. Jednak w przypadku 5% kropli może być to kwestia dyskusyjna i zależna od schematu dawkowania.

⁴ $M_{\text{ceftazydymu bezwodnego}} = 546,58 \text{ g/mol}$ [18]

⁵ $M_{\text{pirydyny}} = 79,10 \text{ g/mol}$ [149]

Z przeliczenia stechiometrycznego mas molowych ceftazydymu i pirydyny wynika, że maksymalna dawka dobową pirydyny ($PDE = 2 \text{ mg}$) powstaje na skutek degradacji 13,82 mg ceftazydymu. Przy założeniu 10% degradacji ceftazydymu w kroplach (limit trwałości kropli), 2 mg pirydyny powstałyby podczas 10% rozkładu 138,2 mg ceftazydymu. Przeliczono i przedstawiono poniżej, jaka ilość kropli (ml), przy założeniu maksymalnej, 10% degradacji antybiotyku, może zostać zaaplikowana pacjentowi w ciągu doby, aby nie przekroczyć limitu PDE pirydyny = 2 mg. Ilość ta zależy od wyjściowego stężenia ceftazydymu w kroplach, co zostało przedyskutowane poniżej.

Wyjściowe stężenie ceftazydymu w kroplach	Ilość kropli do oczu z ceftazydymem, zawierająca nie więcej niż 2 mg pirydyny (przy założeniu 10% degradacji antybiotyku)
1%	13,82 ml
5%	2,76 ml

1% krople, zarówno w wersjach recepturowych i przemysłowych, przeznaczone są do stosowania w przypadkach łagodnych zakażeń lub jako kontynuacja intensywnego leczenia klinicznego. Przy zwykle stosowanym dawkowaniu nie ma możliwości zużycia w ciągu jednej doby więcej niż 13,82 ml kropli, czyli takiej ilości, która nawet przy założeniu 10% degradacji antybiotyku nie zawiera więcej niż 2 mg pirydyny. Potwierdzają to również wyniki analizy HPLC zawartości pirydyny w 1% kroplach (tabela 64 i 66): w okresie trwałości każdej wersji 1% kropli zawartość pirydyny jest poniżej limitu oznaczalności, czyli poniżej 0,192 mg/ml.

W przypadku zwykle stosowanego dawkowania 5% kropli: kilka razy dziennie po 1-2 krople do oka, nawet przy założeniu 10% degradacji kropli „wzmocnionych” nie powinien zostać przekroczony limit PDE pirydyny. Jednak krople o stężeniu 5% przeznaczone są przede wszystkim do stosowania w przypadku zakażeń o ostrym przebiegu, w tym także zakażeń wywołanych pałeczką ropy błękitnej. Dawkowanie może być wówczas bardzo intensywne. W oparciu o dawkowanie kropli z ceftazydymem, zastosowane w przypadku bardzo szybko rozwijającego się bakteryjnego owrzodzenia rogówki [100] przeliczono, że w ciągu doby może zostać zużyte nawet 6 ml kropli. Mógłby zostać wówczas przekroczony maksymalny dobowy limit spożycia pirydyny. Należy jednak uwzględnić fakt, że tak intensywne dawkowanie prowadzone było tylko przez pierwsze 3 dni terapii, w ciągu których rozkład ceftazydymu wynosi około 2%

(warunki przechowywania kropli: 4°C, w oparciu o wyniki: tabele 46 - 49). Wówczas ilość pirydyny w dawce dobowej nie przekroczyłaby dopuszczalnych limitów. Ponadto nie jest znana biodostępność pirydyny po podaniu do oka. W celu dokładnego określenia trwałości kropli z ceftazydymem, limitowanego również stężeniami pirydyny, należałoby w pierwszej kolejności przeprowadzić badania dostępności biologicznej pirydyny z worka spojówkowego. Wyniki takich badań mogłyby być podstawą do określenia maksymalnych stężeń pirydyny w preparatach do oczu, które prawdopodobnie okazałyby się niższe niż limity PDE, w oparciu o które przeprowadzono powyższą analizę.

Analiza zawartości pirydyny prowadzona była także w kroplach przechowywanych w temperaturze 20°C. Ze względu na intensywniejszy rozkład ceftazydymu w tej temperaturze przechowywania, odnotowano również pojawiające się większe stężenia pirydyny (tabele 64 i 65). W 30 dniu analizy kropli najwyższe stężenie pirydyny odnotowano dla 5% kropli konserwowanych i o zwiększonej lepkości, czyli dla wersji IVR. Stężenie pirydyny wynosiło 4,1 mg/ml i odpowiadało stechiometrycznie ilości rozłożonego ceftazydymu w 30 dniu analizy tej wersji kropli. Dla pozostałych wersji roztworów wodnych i kropli oznaczona ilość pirydyny również odpowiadała stechiometrycznie ilości rozłożonego ceftazydymu, lub była nieznacznie niższa, co można tłumaczyć sorpcją pirydyny do gumowych korków [109].

❖ **Możliwość wykorzystania opracowanych technologii w praktyce**

Założeniem niniejszej pracy była odpowiedź na realne zapotrzebowanie kliniczne na preparat z ceftazydymem w postaci kropli do oczu, produkowanych recepturowo lub dostępnych jako gotowy preparat handlowy, o trwałości umożliwiającej przeprowadzenie pełnej kuracji w warunkach klinicznych lub w domu przez pacjenta.

Przyjęte w niniejszej pracy cele i założenia zostały zrealizowane. Przeprowadzone badania wykazały możliwość sporządzania 1% lub 5% kropli do oczu z ceftazydymem w zaproponowanych wersjach recepturowych o trwałości umożliwiającej kilkunastodniową miejscową antybiotykoterapię. Udowodniono również zasadność i możliwość wykorzystania w praktyce zaproponowanej technologii dwukomorowej dla wersji przemysłowych kropli. Zastosowane do wersji przemysłowych rozpuszczalniki są trwałe i nie powodują obniżenia trwałości kropli, także po uprzednim poddaniu rozpuszczalników testowi przyspieszonego starzenia. Rozwiązanie dwukomorowe dla kropli do oczu z ceftazydymem jest także technologiczną odpowiedzią na propozycję mrożenia gotowych kropli z ceftazydymem, podaną przez zespół Chédru-Legros i wsp. [136-137].

Wyniki zrealizowanych w niniejszej pracy badań mogą stać się podwalinami do wprowadzenia na rynek gotowego preparatu z ceftazydymem w postaci kropli do oczu, wykonanych w technologii dwukomorowej. Wyniki przeprowadzonych badań mogą być także z powodzeniem zastosowane w praktyce klinicznej przy produkcji recepturowych kropli z ceftazydymem, zarówno przez apteki szpitalne jak i apteki otwarte. Preparat ten może stać się lekiem pierwszego rzutu w przypadkach ciężkich zakażeń bakteryjnych narządu wzroku, o burzliwym, gwałtownym przebiegu, w szczególności zakażeń pałeczką *Pseudomonas aeruginosa*, która wykazuje znaczną oporność na stosowane obecnie antybiotyki.

Badaniami, które należałoby rozwinąć w przypadku wprowadzania preparatu na rynek farmaceutyczny są badania dotyczące produktu rozkładu ceftazydymu - pirydyny, ponieważ w chwili obecnej nie istnieją normy dotyczące maksymalnych stężeń pirydyny w preparatach stosowanych do oka.

VI WNIOSKI

1. Substancje pomocnicze, zastosowane w składzie kropli do oczu, wykazują pełną zgodność z ceftazydymem i gwarantują sporządzonym z ich użyciem kroplom zgodność z wymaganiami FP VII i Ph.Eur. 6.0, dotyczącymi pH, ciśnienia osmotycznego i lepkości.
2. Koncepcja kropli „przemysłowych”, oparta na technologii dwukomorowej jest trafna, uzasadniona oraz możliwa do zastosowania w praktyce. Trwałość fizyczna rozpuszczalników, określona testem długoterminowym i przyspieszonym (ICH), a także skuteczność ochrony przeciwdrobnoustrojowej w przypadku rozpuszczalników zawierających środki konserwujące, gwarantuje sporządzonym z ich użyciem kroplom „przemysłowym” zgodność z wymaganiami farmakopealnymi oraz z założeniami przyjętymi w celu pracy.
3. Jałowe rozpuszczalniki, przeznaczone do sporządzania kropli „przemysłowych”, powinny być przechowywane w temperaturze nie przekraczającej 25°C. Gwarantuje to ich trwałość fizyczną (brak istotnych zmian pH, ciśnienia osmotycznego i lepkości) przez okres minimum 12 miesięcy. Krótkotrwała ekspozycja rozpuszczalników na wyższą temperaturę, nie przekraczającą 40°C, nie powinna w istotny sposób wpłynąć na ich właściwości fizyczne oraz trwałość fizykochemiczną sporządzonych z ich użyciem kropli z ceftazydymem.
4. 1% i 5% roztwory wodne ceftazydymu, bez dodatku środków izotonizujących, nie mogą być stosowane w charakterze kropli do oczu ze względu na hiposmotyczność z płynem łzowym. Zastosowanie buforu cytrynianowego gwarantuje zgodność 1% i 5% kropli z wymaganiami farmakopealnymi pod względem ciśnienia osmotycznego.
5. Krytycznym czynnikiem trwałości kropli do oczu z ceftazydymem jest temperatura przechowywania. 1% i 5% krople z ceftazydymem w zaproponowanych wersjach recepturowych oraz „przemysłowych” po połączeniu antybiotyku z rozpuszczalnikiem powinny, chronione przed światłem, być przechowywane w temperaturze 4°C.
6. Trwałość kropli z ceftazydymem zależy od stężenia antybiotyku w preparacie. Wyznaczony okres trwałości 5% wersji kropli jest średnio o 6 dni krótszy od okresu trwałości 1% wersji kropli.
7. Spośród zastosowanych w technologii kropli substancji pomocniczych istotny wpływ na ich trwałość wywiera alkohol poliwinylowy. Wyznaczony okres trwałości kropli w wersjach o zwiększonej lepkości jest średnio o 4 dni krótszy od okresu trwałości kropli w wersjach o niemodyfikowanej lepkości. Obecność w składzie kropli substancji konserwujących, tj. boranu fenylortęciowego oraz alkoholu β-fenylloetylowego obniża ich trwałość w stopniu nieistotnym.

8. Alkohol poliwinylowy może być z powodzeniem stosowany w celu modyfikacji lepkości 1% i 5% kropli recepturowych i „przemysłowych” z ceftazydymem. W kroplach wykazuje odpowiednią trwałość, o czym świadczy niezmienna lepkość kropli w czasie ich przechowywania w temperaturze 4°C.
9. Zastosowana w analizie ilościowej ceftazydymu w kroplach metoda HPLC jest specyficzna, liniowa w przyjętym zakresie stężeń, charakteryzuje się wysoką dokładnością i precyzją a także odpornością na niewielkie zmiany składu fazy ruchomej w przebiegu analizy. Umożliwiła również dodatkowe oznaczenie produktu rozkładu ceftazydymu - pirydyny.
10. Trwałość chemiczna 1% kropli z ceftazydymem nie pokrywa się z ich trwałością w aspekcie aktywności przeciwdrobnoustrojowej ze względu na zupełnie odmienną metodologię oznaczeń. Porównanie trwałości kropli obiema metodami jest możliwe jedynie po uprzedniej współbieżnej walidacji.
11. Oznaczone stężenia pirydyny są znacznie niższe od stężeń, dla których udowodniono brak toksyczności miejscowej po podaniu do oka. Ze względu na brak norm dotyczących dopuszczalnych stężeń pirydyny w preparatach do oczu, nie można jednoznacznie określić, czy powstała w okresie trwałości kropli pirydyna będzie dodatkowym czynnikiem limitującym trwałość kropli z ceftazydymem.
12. Zaproponowane technologie 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach recepturowych oraz „przemysłowych” po połączeniu antybiotyku z rozpuszczalnikiem, charakteryzują się trwałością umożliwiającą przeprowadzenie pełnej, kilkunastodniowej miejscowej antybiotykoterapii.
13. Zaproponowane technologie 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach recepturowych mogą z powodzeniem zostać zastosowane w praktyce klinicznej. Krople recepturowe mogą być sporządzane zarówno przez apteki szpitalne jak i apteki otwarte.
14. Zaproponowana handlowa postać 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem, oparta na technologii dwukomorowej, charakteryzuje się znaczną trwałością oraz nieskomplikowaną i szybką zasadą przygotowania preparatu gotowego do użycia. Stanowi propozycję dla przemysłu farmaceutycznego wprowadzenia na rynek nowej i pożądanej klinicznie postaci leku do stosowania miejscowego w bakteryjnych infekcjach oczu.

VII STRESZCZENIE

Badania, przeprowadzone w ramach niniejszej pracy, dotyczyły technologii kropli do oczu z ceftazydymem, antybiotykiem należącym do III generacji cefalosporyn, o szczególnej aktywności wobec *Pseudomonas aeruginosa*. Zaproponowano technologię oraz dokonano oceny trwałości fizykochemicznej 1% i 5% kropli do oczu w wersjach recepturowych oraz „przemysłowych”. Punktem wyjścia do realizacji założeń pracy były badania prowadzone wcześniej przez A. Kodym i wsp. w Katedrze Technologii Postaci Leku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, dotyczące technologii 1% kropli do oczu z ceftazydymem i ich trwałości w aspekcie aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Pierwszy etap badań dotyczył technologii i trwałości kropli recepturowych. Zaprojektowano krople w dwóch stężeniach: 1% i 5%, w wersjach zarówno konserwowanych jak i bez konserwantów, a także w wersjach o zwiększonej lepkości. Substancje pomocnicze zostały tak dobrane, aby krople posiadały optymalne właściwości z punktu widzenia trwałości antybiotyku oraz parametry fizyczne, leżące w granicach tolerancji oka i zgodne z wymaganiami farmakopealnymi: pH, ciśnienie osmotyczne oraz lepkość. Jako źródło ceftazydymu użyto preparatu Biotum, handlowej postaci leku do sporządzania roztworów do iniekcji, zawierającej ceftazydym z węglanem sodu. Krople buforowane były buforem cytrynianowym o pH 6,24. Jako substancji konserwujących użyto boran fenylortęciowy w połączeniu z alkoholem β -fenyloetylowym, natomiast w celu zwiększenia lepkości zastosowano alkohol poliwinylowy. Ponadto zostały sporządzone 1% i 5% roztwory wodne antybiotyku, które posłużyły jako próby odniesienia w prowadzonych analizach. Krople i roztwory wodne przechowywano bez dostępu światła przez okres 30 dni w temperaturze 4°C oraz w celach porównawczych w temperaturze 20°C. Bezpośrednio po sporządzeniu oraz w trakcie przechowywania, w trydniowych odstępach czasu dokonywano oceny fizykochemicznej i organoleptycznej roztworów i kropli. W ramach oceny fizycznej oznaczano pH, ciśnienie osmotyczne oraz w przypadku wersji zawierającej alkohol poliwinylowy oznaczano lepkość. Trwałość chemiczną określano metodą HPLC. Zastosowana metoda HPLC została zwalidowana pod kątem specyficzności, liniowości, dokładności, precyzji, granic wykrywalności i oznaczalności, a także odporności metody na zmiany składu fazy ruchomej.

Wyniki badań wykazały, że wszystkie wersje kropli recepturowych były zgodne z wymogami farmakopealnymi pod względem właściwości fizycznych oraz spełniały założenia celu pracy. Trwałość kropli, określona czasem, w którym zawartość ceftazydymu w kroplach chronionych przed światłem i przechowywanych w temperaturze 4°C utrzymywała się na poziomie nie niższym niż 90% początkowego stężenia wynosiła od 12 do 27 dni, w zależności od wersji recepturowej. Stwierdzono, że decydujący wpływ na trwałość ceftazydymu w kroplach miała temperatura przechowywania. W temperaturze 20°C krople zachowały 90% zawartości

początkowej ceftazydymu maksymalnie przez okres 3 dni. Odnotowano również wpływ stężenia antybiotyku w kroplach na ich trwałość. 5% krople charakteryzowały się o około 6 dni krótszym okresem trwałości niż 1% krople. Natomiast spośród zastosowanych substancji pomocniczych istotny wpływ na trwałość preparatu wywierał alkohol poliwinylowy, obniżając okres trwałości kropli średnio o 4 dni w porównaniu do wersji o niemodyfikowanej lepkości.

Wyniki badań wersji recepturowych kropli były punktem wyjściowym w opracowaniu technologii kropli „przemysłowych”. Ze względu na niską trwałość ceftazydymu w roztworach wodnych, wersje „przemysłowe” oparto na technologii dwukomorowej, polegającej na osobnym przechowywaniu antybiotyku i gotowego rozpuszczalnika, które są łączone dopiero przed aplikacją kropli. Skład i sposób sporządzania rozpuszczalników do „przemysłowych” kropli z ceftazydymem opracowano na podstawie wyników badań trwałości fizykochemicznej kropli recepturowych. Założono, że przed połączeniem antybiotyku z rozpuszczalnikiem gotowy produkt w postaci dwukomorowej powinien być przechowywany w temperaturze pokojowej, tj. 15-25°C. Trwałość antybiotyku w postaci suchej, deklarowana przez producenta preparatu Biotum, wynosi w tych warunkach temperaturowych 2 lata. W celu określenia trwałości rozpuszczalników, zgodnie z wytycznymi ICH zamieszczonymi w załączniku Q1A(R2), przeprowadzono badania trwałości rozpuszczalników testem długoterminowego starzenia przez okres 12 miesięcy i testem przyspieszonego starzenia przez okres 6 miesięcy. Bezpośrednio po sporządzeniu oraz w trakcie przechowywania w warunkach podanych przez ICH, w odstępach trzymiesięcznych prowadzono ocenę fizyczną i organoleptyczną rozpuszczalników. Ponadto po przeprowadzonym teście długoterminowym wykonano badanie skuteczności przeciwdrobnoustrojowej wg FP VII dla wersji rozpuszczalników konserwowanych. Wyniki otrzymanych badań wykazały, że skład i sposób sporządzania rozpuszczalników gwarantuje ich trwałość fizyczną przez okres 12 miesięcy w temperaturze pokojowej oraz zgodność kropli „przemysłowych” z wymogami farmakopealnymi oraz z założeniami przyjętymi w celu pracy.

Ostatnim etapem badań było określenie trwałości kropli z ceftazydymem, sporządzonych z użyciem gotowych rozpuszczalników. Każdą wersję kropli „przemysłowych” sporządzono przez rozpuszczenie jałowej, handlowej postaci ceftazydymu w odpowiednim rozpuszczalniku. Do wykonania kropli użyto rozpuszczalników bezpośrednio po sporządzeniu oraz rozpuszczalników, poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia. Krople „przemysłowe”, w trakcie przechowywania bez dostępu światła przez okres 30 dni w temperaturze 4°C, poddano ocenie fizykochemicznej, zgodnie z kryteriami wcześniej przyjętymi dla wersji recepturowych kropli. Trwałość wszystkich wersji „przemysłowych” 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem, wykonanych zarówno z użyciem rozpuszczalników świeżo sporządzonych jak i poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia, przechowywanych w temperaturze 4°C

była zbliżona do trwałości wyznaczonych wcześniej wersji recepturowych. Nie odnotowano również żadnych istotnych zmian fizycznych w kroplach „przemysłowych”.

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają możliwość sporządzania kropli w zaproponowanej technologii dwukomorowej. Krople takie mogą być przechowywane w temperaturze pokojowej do momentu połączenia antybiotyku z rozpuszczalnikiem przez okres co najmniej 12 miesięcy. Przygotowanie preparatu gotowego do użycia z wykorzystaniem technologii kropli „przemysłowych” jest dużo prostsze niż wykonanie kropli recepturowych, ponieważ polega jedynie na połączeniu komórek i rozpuszczeniu antybiotyku w gotowym rozpuszczalniku. Trwałość kropli recepturowych i „przemysłowych”, jako gotowego preparatu, jest zbliżona.

Badania, zrealizowane w ramach niniejszej pracy mogą stać się podwalinami do wprowadzenia na rynek gotowego preparatu z ceftazydymem w postaci kropli do oczu, wykonanych w technologii dwukomorowej. Zaproponowana technologia kropli recepturowych może być natomiast z powodzeniem zastosowana w praktyce klinicznej. Krople te mogą być sporządzane zarówno przez apteki szpitalne jak i apteki otwarte.

VII SUMMARY

Title of the doctoral dissertation:

“THE STABILITY OF CEFTAZIDIME IN EYE DROPS”

Research conducted for this study was associated with the technology of ceftazidime-containing eye drops. Ceftazidime is an antibiotic belonging to the group of 3rd generation cephalosporins, demonstrating a special activity towards *Pseudomonas aeruginosa*. A technology was suggested and physical-chemical stability of 1% and 5% eye drops in both formulary and “commercial” versions was evaluated. The starting point for realisation of assumptions of the study was the previous research by A. Kodym et al. at the Department of Drug Form Technology of the Poznan University of Medical Sciences, regarding technology of 1% eye drops with ceftazidime and their stability in aspect of antimicrobial activity.

The first stage of the research was focused on technology and stability of formulary eye drops. Eye drops in two concentrations – 1% and 5% - were designed, both with and without preservatives, as well in versions demonstrating increased viscosity. Excipients were selected to ensure eye drops’ optimal properties from the point of view of antibiotic stability, and to ensure physical properties of pH, osmotic pressure and viscosity consistent with eye toleration and with requirements of the Pharmacopoeia. The Biotum preparation being a commercial form of drug for preparation of injection solutions, containing cefazidime and sodium carbonate, was used as a source of ceftazidime. Eye drops were buffered with citrate buffer, pH 6.24. Phenylmercuric borate combined with β -phenylethyl alcohol was used as a preservative. Polyvinyl alcohol was used to increase viscosity. 1% and 5% aqueous solutions of the antibiotic were also prepared. They were used as reference for analysis. Eye drops and aqueous solutions were stored for 30 days at 4°C, protected from light, and also at 20°C for comparison purposes. Physical-chemical and organoleptic evaluation of eye drops and solutions was performed directly after preparation and in three-days intervals during the storage period. Physical evaluation involved determination of pH, osmotic pressure and – in case of the polyvinyl alcohol-containing version - viscosity. Chemical stability was determined using HPLC. The applied HPLC method was validated for specificity, linearity, accuracy, precision, limit of detection and limit of quantification, and also for robustness of the method towards the mobile phase composition changes.

Results of the study demonstrated that all versions of formulary eye drops were consistent with requirements of the Pharmacopoeia in scope of physical properties and met assumptions of the purpose of the study. Stability of eye drops, defined as a time during which ceftazidime content in eye drops protected from light and stored at 4°C, was maintained at the level not lower than 90% of the initial concentration for 12 to 27 days, depending on the version of formulation. It was found out that storage temperature was the deciding factor for stability of ceftazidime eye drops. At 20°C the eye drops maintained 90% of the initial ceftazidime content for maximum of 3 days. An effect of antibiotic concentration on eye drops’ stability was also noted. 5% eye drops were characterised by 6 days shorter stability period compared to 1% eye drops. Among the applied excipients, a significant effect on stability of the preparation was exerted by polyvinyl

alcohol. Addition of the alcohol caused mean reduction of the stability period by 4 days compared to the version of unmodified viscosity.

Results of tests of formulary versions of eye drops constituted a starting point for development of “commercial” eye drops. Considering low stability of ceftazidime in aqueous solutions, “commercial” versions were based on a double-chamber technology: separate storage of the antibiotic and the solvent. They would be combined immediately before application of eye drops. Composition and method of preparation of solvents for “commercial” eye drops with ceftazidime were developed based on results of physical-chemical stability testing of formulary eye drops. It was assumed that before combination of the antibiotic with solvent, a finished product in its double-chamber form should be stored at room temperature, 15 – 25°C. Stability of the antibiotic in a dry form declared by the manufacturer of the Biotum preparation for those temperature conditions is 2 years. According to ICH guidelines published in the Q1A(R2) annex, long-term stability testing for 12 months, and accelerated stability testing for 6 months were used to determine stability of solvents. Physical and organoleptic evaluation of solvents were performed directly after preparation and in three-months intervals of storage in conditions defined by ICH. Moreover, after conclusion of long-term stability tests, an antimicrobial activity test was performed, according to Polish Pharmacopoeia VII for preserved solvent versions. Obtained results demonstrated that composition and preparation method of solvents guarantee their physical stability for 12 months at room temperature, and consistence of “commercial” eye drops with requirements of the Pharmacopoeia and assumptions of the purpose of the study. The last stage of the study was determination of stability of ceftazidime-containing eye drops prepared with ready-made solvents. Each version of “commercial” eye drops was prepared by dissolution of sterile, commercial form of ceftazidime in an appropriate solvent. Freshly prepared solvents and solvents after the accelerated stability test were used for preparation of eye drops. Physical-chemical properties of “commercial” eye drops, stored for 30 days at 4°C and protected from light, were evaluated according to criteria previously accepted for formulary versions of eye drops. Stability of all “commercial” versions of 1% and 5% ceftazidime eye drops, prepared both with freshly prepared solvents and with solvents after the accelerated stability test, stored at 4°C was similar to values determined previously for formulary versions. No significant physical changes were detected in “commercial” eye drops.

Results of the study confirm possibility of preparation of eye drops using the suggested double-chamber method. Those eye-drops may be stored at room temperature for at least 12 months, before the antibiotic becomes combined with a solvent. Preparation of a ready to use preparation with “commercial” eye drops is much simpler comparing to preparation of formulary eye drops, as it involves only fusion of both chambers and dissolution of the antibiotic in a ready-made solvent. Stability of formulary and “commercial” eye drops in form of a preparation ready

for use is similar. Research completed for this study may become a basis for introduction of a ready-made ceftazidime preparation in form of eye drops, produced in the double-chamber technology, to the market. The suggested technology of formulary eye drops may be successfully applied to clinical practice. Those eye drops may be prepared by both hospital pharmacies and open ones.

VIII PIŚMIENNICTWO

1. Meszaros J.: Cefalosporyny - 50 lat po odkryciu. *Przew Lek.* 2000; 50:93-9
2. Bo G.: Giuseppe Brotzu and the Discovery of cephalosporins. *Clin Microbiol Infect.* 2000; 6(3):6-8
3. Hamilton-Miller J. M. T.: Sir Edward Abraham's contribution to the development of the cephalosporins: a reassessment. *Int J Antimicrob Agents.* 2000; 15:179-184
4. Hamilton-Miller J. M. T.: Development of the semi-synthetic penicillins and cephalosporins. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31:189-192
5. Burton H. S., Abraham E. P.: Isolation of antibiotics from a species of cephalosporium. Cephalosporins P₁, P₂, P₃, P₄ and P₅. *Biochem J.* 1951; 50:168-174
6. Newton G. G. F., Abraham E. P.: Degradation, structure and some derivatives of cephalosporin N. *Biochem J.* 1954; 58:103-111
7. Abraham E. P., Newton G. G. F.: The structure of cephalosporin C. *Biochem J.* 1961; 79: 377-393
8. Zajac M., Pawelczyk E.: *Chemia leków.* Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego. Poznań 2006
9. William F., Marshall W. F., Blair J. E.: The cephalosporins. *May Clin Proc.* 1999; 74:187-195
10. El-Shaboury S. R., Saleh G. A., Mohamed F. A., Rageh A. H.: Analysis of cephalosporin antibiotics. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 45:1-19
11. Van Krimpen P. C., Van Bennekom W. P., Bult A.: Penicillins and cephalosporins. Physicochemical properties and analysis in pharmaceutical and biological matrices. *Pharm Weekblad.* 1987; 9:1-23
12. Dzierżanowska D.: *Antybiotykoterapia praktyczna.* α-medica press. Bielsko-Biała 2008
13. Janiec W., Krupińska J.: *Farmakodynamika.* PZWL. Warszawa 2005
14. Karaś M., Drożański W., Russa R.: Peptydoglikan gram-ujemnych pałeczkowatych bakterii. *Post Mikrobiol.* 2006; 45(1):27-38
15. Williams J. D.: Classification of cephalosporins. *Drugs.* 1987; 34(Suppl 2):15-22
16. Williams J.D., Naber K. G., Bryskier A., Høiby N., Gould I. M., Periti P., Giamarellou H., Rouveix B.: Classification of oral cephalosporins. A matter for debate. *Int J Antimicrob Ag.* 2001; 17:443-450
17. Jarecki M., Jarecka M.: Cefazydym – antybiotyk z wyboru w leczeniu ciężkich zakażeń bakteryjnych. *Mag Med.* 1997; 8(7):52-4
18. *Farmakopea Polska VII,* Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych. Warszawa 2006
19. Neu. H.C.: Relation of structural properties of beta-lactam antibiotics to antibacterial activity. *Am J Med.* 1985; 79:2-13
20. Gozzard D.I., Geddes A.M., Farrell I.D., Eykyn S.J., Phillips I., Wise R., Brown R.M.: Cefazidime - a new extended-spectrum cephalosporin. *Lancet.* 1982; 22;1(8282):1152-6.

21. Zemelman C., Bello H., Domínguez M., González G., Mella S., Zemelman R.: Activity of cefepime, cefotaxime, ceftazidime, and aztreonam against extended-spectrum-producing isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from Chilean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001; 40(1-2):41-3
22. Mushtaq S., Warner M., Livermore D.M.: In vitro activity of ceftazidime +NXL104 against *Pseudomonas aeruginosa* and other non-fermenters. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(11):2376-81
23. Hamilton-Miller J.M., Brumfitt W.: Activity of ceftazidime (GR 20263) against nosocomially important pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 1981; 19(6):1067-69
24. Lambert H. P., O'Grady F. W.: *Antybiotyki i chemioterapia.* Wydawnictwo medyczne. Warszawa 1994
25. Buijk S.L., Gyssens I.C., Mouton J.W., Van Vliet A., Verbrugh H.A., Bruining H.A.: Pharmacokinetics of ceftazidime in serum and peritoneal exudate during continuous versus intermittent administration to patients with severe intra-abdominal infections. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49(1):121-8
26. Mouton J.W., Horrevorts A.M., Mulder P.G., Prens E.P., Michel M.F.: Pharmacokinetics of ceftazidime in serum and suction blister fluid during continuous and intermittent infusions in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34(12):2307-11
27. Ljungberg B., Nilsson-Ehle I.: Comparative pharmacokinetics of ceftazidime in young, healthy and elderly, acutely ill males. *Eur J Clin Pharmacol.* 1988; 34(2):179-86
28. Paradis D., Vallée F., Allard S., Bisson C., Daviau N., Drapeau C., Auger F., LeBel M.: Comparative study of pharmacokinetics and serum bactericidal activities of cefpirome, ceftazidime, ceftriaxone, imipenem, and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36(10):2085-92
29. Welage L.S., Schultz R.W., Schentag J.J.: Pharmacokinetics of Ceftazidime in Patients with Renal Insufficiency. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984; 25(2):201-4
30. Leroy A., Leguy F., Borsa F., Spencer G.R., Fillastre J.P., Humbert G.: Pharmacokinetics of ceftazidime in normal and uremic subjects. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984; 25(5):638-42
31. Walstad R.A., Blika S., Thurmann-Nielsen E. Halvorsen T.B.: The penetration of ceftazidime into inflamed rabbit eye. *Scand J Infect Dis.* 1987; 19(1):131-5
32. Schech J.M., Alfaro D.V., Laughlin R.M., Sanford E.G., Briggs J., Dalgetty M.: Intravenous gentamicin and ceftazidime in penetrating ocular trauma: a swine model. *Retina.* 1997; 17(1):28-32
33. Waga J., Nilson-Ehle I., Jungberg B., Skarin A., Stähle L., Ehinger B.: Microdialysis for pharmacokinetic studies of ceftazidime in rabbit vitreous. *J of Ocul Pharm.* 1999; 15:455-63
34. Ozirkis A., Evereklioglu C., Akgun H., Cancer F., Erkilic K.: A comparison of intravitreal piperacillin/tazobactam with ceftazidime in experimental *Pseudomonas aeruginosa* endophthalmitis. *Exp Eye Res.* 2005; 80:361-7
35. Meredith T.A.: Antimicrobial pharmacokinetics in endophthalmitis treatment: studies of ceftazidime. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1993; 91:653-99

36. Wrzesień-Kuś A., Lech-Marańda E., Robak T.: Zastosowanie cefepimu lub ceftazydymu skojarzonych z amikacyną w empirycznym leczeniu gorączki u chorych z neutropenią. *Acta Haematologica Polonica*. 2000; 31(1):79-85
37. Harter C., Schulze B., Goldschmidt H., Benner A., Geiss H.K., Hoppe-Tichy T., Ho A.D., Egerer G.: Piperacillin/tazobactam vs ceftazidime in the treatment of neutropenic fever in patients with acute leukemia or following autologous peripheral blood stem cell transplantation: a prospective randomized trial. *Bone Marrow Transplant*. 2006; 37(4):373-9
38. Samonis G., Koutsounaki E., Karageorgopoulos D.E., Mitsikostas P., Kalpadaki C., Bozionelou V., Bompolaki I., Sgouros J., Taktikou V., Falagas M.E.: Empirical therapy with ceftazidime combined with levofloxacin or once-daily amikacin for febrile neutropenia in patients with neoplasia: a prospective comparative study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Oct 31 [Epub ahead of print]
39. Huang C.C., Wu C.J., Wang L.R., Lee H.C., Chang C.M., Lee N.Y., Chen T.Y., Ko W.C.: Antimicrobial susceptibility of bacteremic isolates from cancer patients with or without neutropenia at a medical center in southern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2011; 44(5):376-81
40. Metallidis S., Kollaras P., Giannakakis T., Seitanidis B., Kordosis T., Nikolaidis J., Hatzitolios A., Nikolaidis P.: A prospective, controlled, randomized, non-blind, comparative study of the efficacy and safety of a once daily high dose of ceftriaxone plus ciprofloxacin versus thrice daily ceftazidime plus amikacin in empirical therapy for febrile neutropenic patients. *Eur J Intern Med*. 2008; 19(8):619-24
41. Meszaros J.: Miejsce cefalosporyn i aminoglikozydów we współczesnej terapii zakażeń. *Ter i Leki*. 2000; 50:29-34
42. Koepler H., Pflueger K.H., Seitz R., Havemann K.: Three-step empiric treatment for severely neutropenic patients with fever: ceftazidime - vancomycin - amphotericin B. *Infection*. 1979; 17(3):142-5
43. Hryniewicz W., Ozorowski T.: Szpitalna lista antybiotyków, Moduł I: Monitorowanie zakażeń szpitalnych oraz inwazyjnych zakażeń bakteryjnych dla celów epidemiologicznych, terapeutycznych i profilaktycznych na lata 2009 - 2013
44. Narsani A.K., Jatoi S.M., Gul S., Dabir S.A.: Efficacy of intravitreal ceftazidime in acute postoperative endophthalmitis. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2008; 18(2):98-101
45. Alfaro D.V. 3rd, Hudson S.J., Kasowski E.J., Barton C.P., Brucker A.J., Lopez J.D., Beverly D.T., King L.P.: Experimental pseudomonal posttraumatic endophthalmitis in a swine model. Treatment with ceftazidime, amikacin, and imipenem. *Retina*. 1997; 17(2):139-45
46. Manav Ay G., Cetin Akhan S., Erturk S., Aktas E. S., Özkara S. K., Caglar Y.: Comparison of intravitreal ceftazidime and meropenem in treatment of experimental pseudomonal posttraumatic endophthalmitis in a rabbit model. *Journal of Applied Research*. 2004; 4(2):336-45
47. Kański J.J., Kubicka-Trząska A.: Choroby infekcyjne oczu. Kompendium diagnostyki i leczenia. Górnicki Wydawnictwo Medyczne. Wrocław 2004
48. Zagórski Z., Naumann G., Watson P.: Choroby twardówki, rogówki i powierzchni oka. Czelej Sp. z o.o. Lublin 2008

49. Hryniewicz W., Meszaros J.: Antybiotyki w profilaktyce i leczeniu zakażeń. PZWL. Warszawa 2001
50. Niżankowska M.H. .: Okulistyka. Podstawy kliniczne. PZWL. Warszawa 2007
51. Yonekawa Y., Chan R.V., Reddy A.K., Pieroni C.G., Lee T.C., Lee S.: Early intravitreal treatment of endogenous bacterial endophthalmitis. Clin Experiment Ophthalmol. 2011; 39(8):771-8
52. Hussain N., Natarajan S., Hussain A., Jadhav S.L., Malpani A.: Management of post-surgical endophthalmitis. Journal of the BOA. 2001; 11(2):63-6
53. Mrozowski T., Goś R.: Leki okulistyczne, PZWL. Warszawa 2000
54. Aminoglycoside antibiotics. Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions (Fifteenth Edition). 2006. 118-36
55. Lerner S.A., Matz G.J.: Aminoglycoside Ototoxicity. Am J Otolaryngol. 1980; 1(2):169–79
56. Dziewiszek W., Bochnia M., Orendorz-Frączkowska K.: Ototoksyczność antybiotyków aminoglikozydowych. Adv Clin Exp Med. 2004; 13(6):1047-53
57. Waltz K., Margo C.E.: Intraocular gentamicin toxicity. Arch Ophthalmol. 1991; 125(10):1442
58. Thomas T., Galiani D., Brod R.D.: Gentamicin and other antibiotic toxicity. Ophthalmol Clin North Am. 2001; 14(4):611-24
59. Donahue S.P., Kowalski R.P., Eller A.W., DeVaro J.M., Jewart B.H.: Empiric treatment of endophthalmitis. Are aminoglycosides necessary? Arch Ophthalmol. 1994; 112(1):45-7
60. Records R.E.: Gentamicin in ophthalmology. Surv Ophthalmol. 1976; 21:49-58,
61. Green K., Chapman J., Cheeks L.: Ocular toxicity of subconjunctival gentamicin. Lens Eye Toxic Res. 1992; 9(3-4):439-46.
62. Loewenstein A., Zemel E., Vered Y., Lazar M., Perlman I.: Retinal toxicity of gentamicin after subconjunctival injection performed adjacent to thinned sclera. Ophthalmology. 2001; 108(4):759-64
63. Campochiaro P.A., Lim J.I.: Aminoglycoside toxicity in the treatment of endophthalmitis. The Aminoglycoside Toxicity Study Group. Arch Ophthalmol. 1994; 112(1):48-53
64. Aguilar H.E., Meredith T.A., Shaarawy A., Kincaid M., Dick J.: Vitreous cavity penetration of ceftazidime after intravenous administration. Retina. 1995; 15(2):154-9
65. Mochizuki K., Yamashita Y., Torisaki M., Komatsu M., Tanahashi T., Kawasaki K.: Intraocular kinetics of ceftazidime (Modacin). Ophthalmic Res. 1992; 24(3):150-4
66. Sueke H., Kaye S., Neal T., Murphy C., Hall A., Whittaker D., Tuft S., Parry C.: Minimum inhibitory concentrations of standard and novel antimicrobials for isolates from bacterial keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010; 51(5):2519-24
67. Engelbert M., Miño de Kaspar H., Mette M., Thiel M., Ta C.N., Grasbon T., Schulze-Schwering M., Klauss V., Kampik A.: Intravenous treatment of experimental *Staphylococcus aureus* endophthalmitis: imipenem versus the combination of ceftazidime and amikacin. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2003; 241(12):1029-36

68. Hue B., Doat M., Renard G., Brandely M.L., Chast F.: Severe keratitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* successfully treated with ceftazidime associated with acetazolamide. *J Ophthalmol.* 2009; 2009:794935
69. Campochiaro P.A., Green W.R.: Toxicity of intravitreal ceftazidime in primate retina. *Arch Ophthalmol.* 1992; 110(11):1625-9
70. Pathengay A., Trehan H.S., Mathai A., Jalali S., Majji A.B., Das M.K., Sharma S., Das T.: Enterobacter endophthalmitis: clinicomicrobiologic profile and outcomes. *Retina.* 2012; 32(3):558-62
71. Tanabe J., Kitano K., Suzuki T., Okayama Y., Mochizuki K., Kawasaki K.: Nontoxic concentration of ceftazidime and flomoxef sodium for intravitreal use - evaluated by in-vitro ERG. *Lens Eye Toxic Res.* 1990; 7(3-4):677-83
72. Lachapelle K.R.: Comparing the efficacy of intravitreal amikacin and ceftazidime in an aphakic rabbit model of *Pseudomonas* endophthalmitis. A Thesis submitted to the Department of Microbiology and Immunology Queen's University. Kingdton, Canada, 1997
73. Reddy A.K., Garg P., Shah V., Gopinathan U.: Clinical, microbiological profile and treatment outcome of ocular infections caused by *Achromobacter xylosoxidans*. *Cornea.* 2009; 28(10):1100-3
74. Aaberg T.M. Jr, Flynn H.W. Jr, Murray T.G.: Intraocular ceftazidime as an alternative to the aminoglycosides in the treatment of endophthalmitis. *Arch Ophthalmol.* 1994; 112(1):18-9
75. Irvine W.D., Flynn H.W. Jr, Miller D., Pflugfelder S.C.: Endophthalmitis caused by gram-negative organisms. *Arch Ophthalmol.* 1992; 110(10):1450-4
76. Sonmez M., Unal M.H., Yildiz T.F., Gulecek O.: Retinal toxicity of intraocular vancomycin and ceftazidime in vitrectomized rabbit eyes. *Drug Chem Toxicol.* 2006; 29(1):125-34
77. Hegazy H.M., Kivilcim M., Peyman G.A., Unal M.H., Liang C., Molinari L.C., Kazi A.A.: Evaluation of toxicity of intravitreal ceftazidime, vancomycin, and ganciclovir in a silicone oil-filled eye. *Retina.* 1999; 19(6):553-7
78. Roth D.B., Flynn H.W. Jr.: Antibiotic selection in the treatment of endophthalmitis: The significance of drug combinations and synergy. *Surv Ophthalmol.* 1997; 41(5):395-401
79. Cornut P.L., Chiquet C.: Injections intravitréennes d'antibiotiques et endophtalmies. *J Fr Ophtalmol.* 2008; 31(8):815-23
80. Versteegh M.F., Hooymans J.M., De Lavalette V.W., Van Rij G.: Acute bacterial endophthalmitis after cataract extraction: results of treatment. *Doc Ophthalmol.* 2000; 100(1):7-15
81. Mulhern M.G., Condon P.I., O'Keefe M.: Endophthalmitis after astigmatic myopic laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg.* 1997; 23(6):948-50
82. Aggarwal P., Garg P., Sidhu H.K., Mehta S.: Post-traumatic endophthalmitis with retained intraocular foreign body - a case report with review of literature. *Nepal J Ophthalmol.* 2012; 4(7):187-90
83. Chan C.C., Holland E.J.: Infectious endophthalmitis after Boston type 1 keratoprosthesis implantation. *Cornea.* 2012; 31(4):346-9

84. Fernández Mdel P., Villegas V.M., Armando L.O.: Vitreous cultures and antibiotic analysis in Puerto Rican endophthalmitis patients. *P R Health Sci J.* 2011; 30(4):198-202
85. Flynn H.W., Jr.: Recognition, treatment and prevention of endophthalmitis. Bascom Palmer Eye Institute Eye Institute, University Of Miami School Of Medicine, 2010
86. A Newsletter For General Practitioners And Pharmacists In Oxfordshire Produced By The Prescribing Team, Directorate Of Public Health & Health Policy, Oxfordshire Health Authority, Old Road Headington, Oxford Ox3 7lg, 2002; 11(1)
87. Borhani H., Peyman G.A., Wafapoor H.: Use of vancomycin in vitrectomy infusion solution and evaluation of retinal toxicity. *Int Ophthalmol.* 1993; 17(2):85-8
88. Sonmez M., Unal M.H., Yildiz T.F., Gulecek O.: Retinal toxicity of intraocular vancomycin and ceftazidime in vitrectomized rabbit eyes. *Drug Chem Toxicol.* 2006; 29(1):125-34
89. Kwok A.K.H., Hui M., Pang C.P., Chan R.C.Y., Cheung S.W., Yip C.M.S., Lam D.S.C., Cheng A.F.B.: An in vitro study of ceftazidime and vancomycin concentrations in various fluid media: implications for use in treating endophthalmitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43:1182-8
90. Raju B., Bali T., Thiagarajan G., Rao V., Das T., Sharma S.: Physicochemical properties and antibacterial activity of the precipitate of vancomycin and ceftazidime: implications in the management of endophthalmitis. *Retina.* 2008; 28(2):320-5
91. Lifshitz T., Lapid-Gortzak R., Finkelman Y., Klemperer I.: Vancomycin and ceftazidime incompatibility upon intravitreal injection. *Br J Ophthalmol.* 2000; 84:117-21
92. Fiscella R.G.: Physical incompatibility of vancomycin and ceftazidime for intravitreal injection. *Arch Ophthalmol.* 1993; 111(6):730
93. Nicola F.: Non-viral infectious keratitis: predisposing factors, etiologic agents and laboratory diagnosis. *Rev Argent Microbiol.* 2005; 37(4):229-39
94. Schornack M.M., Faia L.J., Griepentrog G.J.: Pseudomonas keratitis associated with daily wear of silicone hydrogel contact lenses. *Eye Contact Lens.* 2008; 34(2):124-8
95. Green M., Apel A., Stapleton F.: Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. *Cornea.* 2008; 27(1):22-7
96. Lau L.I., Wu C.C., Lee S.M., Hsu W.M.: Pseudomonas corneal ulcer related to overnight orthokeratology. *Cornea.* 2003; 22(3):262-4
97. Kremer I., Robinson A., Avisar R., Gatton D., Savir H., Yassur Y.: The combination of topical ceftazidime and aminoglycosides in the treatment of refractory pseudomonas keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1999; 237:177-80
98. Kremer I., Robinson A.: The effect of topical ceftazidime on pseudomonas keratitis in rabbits. *Cornea.* 1994; 13:360-3
99. Moreker M.R., Desai D.K., Sankpal H.S., Goyal V.R., Patel R.C.: Microbiology based therapy in cosmetic CL related polymicrobial keratitis with good visual outcome. *AIOS Office Bearer* 2010
100. Dehghani A.R., Fazel F., Akhlaghi M.R., Ghanbari H., Ilanloo M.R., Ahmadi-Azad D.: Cefazolin-gentamicin versus vancomycin-ceftazidime eye drops for bacterial corneal ulcers; a randomized clinical trial. *J Ophthalmic Vis Res.* 2009; 4(1):19-23

101. Karimian F., Javadi M.A., Babai M., Einollahi B., Zare M.: Comparison of ciprofloxacin 0.3% with fortified topical gentamicin and cefazolin in treatment of bacterial keratitis. *Bina J Ophthalmol.* 1998; 4:235-42
102. Khokhar S., Sindhu N., Mirdha B.R.: Comparison of topical 0,3% ofloxacin to fortified tobramycincefazolin in the therapy of bacterial keratitis. *Infection.* 2000; 28:149-52
103. Rhee M.K., Kowalski R.P., Romanowski E.G., Mah F.S., Ritterband D.C., Gordon Y.J.: A laboratory evaluation of antibiotic therapy for ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Ophthalmol.* 2004; 138(2):226-30
104. Young A.L., Leung A.T., Cheung E.Y., Cheng L.L., Wong A.K., Lam D.S.: Orthokeratology lens-related *Pseudomonas aeruginosa* infectious keratitis. *Cornea.* 2003; 22(3):265-6
105. Moreno Honrado M., del Campo Z., Buil J.A.: A case of necrotizing scleritis resulting from *Pseudomonas aeruginosa*. *Cornea.* 2009; 28(9):1065-6
106. Lee N.E., Chung I.Y., Park J.M.: A case of *Pantoea* endophthalmitis. *Korean J Ophthalmol.* 2010; 24(5):318-21
107. Achach K., Peroux E.: Antibiotics ophthalmics solutions: stability study. *J Pharm Clin.* 1999, 18(1):65-6
108. Peyron F., Ibrachim E., Elias R., Bues-Charbit M., Balansard G.: Stability of fortified ophthalmic solutions of amphotericin B, ceftazidime and vancomycin. *J Clin Pharm.* 1999; 18:48-52
109. Barnes A.R., Nash S.: Stability of ceftazidime in a viscous eye drop formulation. *J Clin Pharm Ther.* 1999; 24:299-302
110. Obwieszczenie Prezesa Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych z dnia 31 marca 2011 r. w sprawie ogłoszenia urzędowego wykazu produktów leczniczych dopuszczonych do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej (załącznik, część 1 a)
111. Charakterystyka Produktu Leczniczego: Biotum
112. Ulotka dla pacjenta: Biotum
113. Zając M., Jelińska A., Sobczak A., Musiał W.: Stability of ceftazidime pentahydrate in medicinal preparations Biotum and Ceftim. *Acta Pol Pharm.* 2005; 62(1):11-5
114. De Haro Moreno A., Salgado H.R.: Stability study and degradation kinetics of ceftazidime in pharmaceutical preparations. *Adv Anal Chem.* 2012; 2(1):1-5
115. Zhou M., Notari R.E.: Influence of pH, temperature, and buffers on the kinetics of ceftazidime degradation in aqueous solutions. *J Pharm Sci.* 1995; 84:534-8
116. Zając M., Siwek J., Muszalska I.: The mechanism of ceftazidime degradation in aqueous solutions. *Acta Pol Pharm.* 1998; 55(4):275-8
117. Fubara J.O., Robert E. Notari.: Kinetic oxymoron: Concentration-dependent first-order rate constants for hydrolysis of ceftazidime. *J Pharm Sci.* 1998; 87:53-8
118. Zając M., Siwek J.: The influence of carbohydrates and polyhydric alcohols on the stability of ceftazidime in aqueous solution. *Acta Pol Pharm.* 1995; 52(2):87-90

119. Porrà R., Farina A., Cotichini V., Lecce R.: Analysis of ceftazidime and related compounds by micellar electrokinetic chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 1998; 18(1-2):241-8
120. Farina A., Porrà R., Cotichini V., Doldo A.: Stability of reconstituted solutions of ceftazidime for injections: an HPLC and CE approach. *J Pharmaceut Biomed Anal.* 1999; 20(3):521-30
121. Servais H., Tulkens P.M.: Stability and compatibility of ceftazidime administered by continuous infusion to intensive care patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:2643-7
122. Baririan N., Chanteux H., Viaene E., Servais H., Tulkens P.M.: Stability and compatibility study of cefepime in comparison with ceftazidime for potential administration by continuous infusion under conditions pertinent to ambulatory treatment of cystic fibrosis patients and to administration in intensive care units. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51(3):651-8
123. Stewart J.T., Warren F.W., Johnson S.M., Fox J.L., Mullaney J.: Stability of ceftazidime in plastic syringes and glass vials under various storage conditions. *Am J Hosp Pharm.* 1992; 49:2765-8
124. Nahata M.C., Morosco R.S., Fox J.L.: Stability of ceftazidime (with arginine) stored in plastic syringes at three temperatures. *Am J Hosp Pharm.* 1992; 49(12):2954-6
125. Stiles M.L., Tu Y.H., Allen L.V. Jr: Stability of cefazolin sodium, cefoxitin sodium, ceftazidime, and penicillin G sodium in portable pump reservoirs. *Am J Hosp Pharm.* 1989; 46(7):1408-12
126. Stiles M.L., Allen L.V. Jr, Fox J.L.: Stability of ceftazidime (with arginine) and of cefuroxime sodium in infusion-pump reservoirs. *Am J Hosp Pharm.* 1992; 49(11):2761-4
127. Viaene E., Chanteux H., Servais H., Mingeot-Leclercq M-P., Tulkens P.M.: Comparative stability studies of antipseudomonal β -lactams for potential administration through portable elastomeric pumps (home therapy for cystic fibrosic patients) and motor-operated syringes (intensive care units). *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(8):2327-32
128. Das Gupta V., Bethea C., Torre M.: Chemical stabilities of cefoperazone sodium and ceftazidime in 5% dextrose and 0,9% sodium chloride injections. *J Clin Pharm Ther.* 1988; 13(3):199-205
129. Favetta P., Allombert C., Breyse C., Dufresne C., Guitton J., Bureau J.: Fortum[®] stability in different disposable infusion devices by pyridine assay. *J Pharm Biomed Anal.* 2002; 27:873-9
130. Arsène M., Favetta P., Favier B., Bureau J.: Comparason of ceftazidime degradation in glass bottles and plastic bags under various conditions. *J Clin Pharm Ther.* 2002; 27:205-9
131. 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(1):17-23
132. Faouzi M.A., Dine T., Luyckx M., Gressier B., Brunet C., Goudaliez F., Mallevais M.L., Cazin M., Cazin J.C.: Stability and compatibility studies of cefaloridine, cefuroxime and ceftazidime with PVC infusion bags. *Pharmazie.* 1994; 49(6):425-7
133. Xu Q.A. Trissel L.A.: stability of three cephalosporin antibiotics in AutoDose Infusion System Bags. *J Am Pharm Ass.* 2002; 42:428-31
134. Jaruratanasirikul S., Sriwiriyan S.: Stability of ceftazidime in normal saline solution after exposure to light. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2001; 32:216-8

135. Hughes W.F. Jr.: The tolerance of rabbit cornea for various chemical substances. Appendix I. Bull Johns Hopkins Hosp. 1948; 82:338-9
136. Chédru-Legros V., Fines-Guyon M., Chérel A., Perdriel A., Albessard F., Debruyne D., Mouriaux F.: Fortified antibiotic (vancomycin, amikacin and ceftazidime) eye drops stability assessment at -20 degrees C. J Fr Ophtalmol. 2007; 30:807-13
137. Chédru-Legros V., Fines-Guyon M., Chérel A., Perdriel A., Albessard F., Debruyne D., Mouriaux F.: In vitro stability of fortified ophthalmic antibiotics stored at -20 degrees C for 6 months. Cornea. 2010; 29(7):807-11
138. Karampatakis V., Papanikolaou T., Giannousis M., Goulas A., Mandraveli K., Kilmpasani M. Alexiou-Daniel S., Mirtsou-Fidani V.: Stability and antibacterial potency of ceftazidime and vancomycin eyedrops reconstituted in BSS against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Acta Ophthalmol. 2009; 87(5):555-8
139. Kodym A., Zawisza T., Napierała B., Kukuła H.: Influence of additives and storage temperature on physicochemical and microbiological properties of eye drop containing ceftazidime. Acta Pol Pharm Drug Res. 2006; 63(6):507-13
140. Stendal T.L., Klem W., Tønnesen H.H., Kjønneksen I.: Drug stability and pyridine generation in ceftazidime injection stored in an elastomeric infusion device. Am J Health Syst Pharm. 1998; 1;55(7):683-5
141. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2000; 77:503-28
142. Shimizu S., Watanabe N., Kataoka T., Shoji T., Abe N., Morishita S., Ichimura H.: Pyridine and pyridine derivatives. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry; 2000
143. Scriven E.F.V., Murugan R.: Pyridine and pyridine derivatives. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology; 2005
144. D'Souza J., Caldwell J., Smith R.L.: Species differences in the N-methylation and quaternization of [¹⁴C]pyridine. Xenobiotica. 1980; 10:151-7
145. Damani L.A., Crooks P.A., Shaker M.S., Caldwell J., D'Souza J., Smith R.L.: Species differences in the metabolic C- and N-oxidation, and N-methylation of [¹⁴C]pyridine in vivo. Xenobiotica. 1982; 12(8):527-34
146. Gorrod J.W., Damani L.A.: The metabolic N-oxidation of 3-substituted pyridines in various animal species in vivo. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 1980; 5(1):53-7
147. Manahan S.E.: Toksykologia środowiska. Aspekty chemiczne biochemiczne., Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2006
148. Toxicological profile for pyridine. Agency for Toxic Substances and Disease Registry U.S. Public Health Service; 1992
149. Pyridine: Material Safety Data Sheet; <http://www.fishersci.com>
150. Karta charakterystyki substancji chemicznej: Pirydyna. POCH
151. Dyrektywa Rady (EWG) z dnia 27 czerwca 1967 r. w sprawie zbliżenia przepisów ustawodawczych, wykonawczych i administracyjnych odnoszących się do klasyfikacji, pakowania i etykietowania substancji niebezpiecznych

152. Kodym A., Hapka-Żmich D., Gołąb M., Gwizdała M.: Stability of ceftazidime in 1% and 5% buffered eye drops determined with HPLC method. *Acta Pol Pharm Drug Res.* 2011; 68:99-107
153. Parnowska W.: *Mikrobiologia farmaceutyczna*. PZWL; Warszawa 1998.
154. *Farmakopea Polska V, tom I*. PZWL; Warszawa 1990
155. Brandrup J., Immergut E. H., Grulke E.A.: *Polymer Handbook*. Willey VCH; 2003
156. Janicki S., Fiebig A., Sznitowska M.: *Farmacja Stosowana. Podręcznik dla studentów farmacji*. PZWL; Warszawa 2008
157. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2). ICH Harmonised Tripartite Guideline 2003
158. *Farmakopea Amerykańska USP 29*
159. Pawlaczyk J., Zając M.: *Walidacja metod analizy chemicznej*. Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Poznań 2005
160. Validation of analytical procedures: Text and methodology. Q2 (R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline 2005
161. Rumiński J. K.: *HPLC Wysokosprawna chromatografia cieczowa*. Toruń 2005
162. Impurities: Guideline for residual solvents. Q3C (R4). ICH 2009
163. 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.”
164. Zawisza T.: *Technologia kropli do oczu z cefazoliną, cefuroksydem i z ceftazydymem*. Praca doktorska wykonana w Katedrze Technologii Postaci Leku Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; 2004
165. Kodym A., Bilski P., Domańska A., Hełminiak Ł., Jabłońska M., Jachymska A.: Physical and chemical properties and stability of sodium cefazolin in buffered eye drops determined with HPLC method. *Acta Pol Pharm Drug Res.* 2012; 69:95-105
166. Kodym A., Wiśniewski A., Kniola D., Olejniczak M.: Stability of cefuroxime in 1% and 5% buffered eye drops determined with HPLC method. *Acta Pol Pharm Drug Res.* 2011; 68:555-64
167. Wiśniewski A.: *Trwałość cefuroksymu w kroplach do oczu*. Praca doktorska wykonana w Katedrze Technologii Postaci Leku Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu; 2011
168. Kodym A., Pawłowska M., Rumiński J.K., Bartosińska A., Kieliba A.: Stability of cefepime in aqueous eye drops. *Pharmazie.* 2011; 66:17-23
169. Smyth H.F. Jr, Carpenter C.P., Weil C.S.: Range-finding toxicity data: list IV. *AMA Arch Ind Hyg Occup Med.* 1951; 4:119-22

IX SPIS TABEL

Tabela 1.	Skład buforów cytrynianowych	53
Tabela 2.	Wyniki oceny fizycznej buforów cytrynianowych	54
Tabela 3.	Skład roztworu alkoholu poliwinylowego	54
Tabela 4.	Wyniki oceny fizycznej roztworu alkoholu poliwinylowego	55
Tabela 5.	Skład roztworu boranu fenylortęciowego	55
Tabela 6.	Badanie zgodności farmaceutycznej 5% roztworów ceftazydymu z substancjami pomocniczymi, zastosowanymi w składzie kropli	56
Tabela 7.	Skład rozpuszczalników do 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”	58
Tabela 8.	Ocena fizyczna rozpuszczalników do 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych” bezpośrednio po sporządzeniu oraz po 3 i 6 miesiącach przechowywania w temperaturze $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, przy wilgotności $60\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$ (test długoterminowy)	61
Tabela 9.	Ocena fizyczna rozpuszczalników do 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych” bezpośrednio po sporządzeniu oraz po 9 i 12 miesiącach przechowywania w temperaturze $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, przy wilgotności $60\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$ (test długoterminowy)	62
Tabela 10.	Ocena fizyczna rozpuszczalników do 1% i 5% kropli z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych” bezpośrednio po sporządzeniu oraz po 3 i 6 miesiącach przechowywania w temperaturze $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, przy wilgotności $75\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$ (test przyspieszony)	63
Tabela 11.	Kryteria oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej dla preparatów do oczu	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 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$	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 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$	67
Tabela 14.	Skład 1% i 5% wodnych roztworów i kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych	71
Tabela 15.	Uzasadnienie składu recepturowego wodnych roztworów i kropli do oczu z ceftazydymem	72
Tabela 16.	Skład 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”	77
Tabela 17.	pH 1% roztworów wodnych oraz kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4°C oraz 20°C	80
Tabela 18.	pH 5% roztworów wodnych oraz kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4°C oraz 20°C	81
Tabela 19.	pH 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, przechowywanych w temperaturze 4°C , wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników	82
Tabela 20.	pH 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, przechowywanych w temperaturze 4°C , sporządzonych z użyciem rozpuszczalników, poddanych przednio testowi przyspieszonego starzenia	83

Tabela 21. Ciśnienie osmotyczne 1% roztworów wodnych oraz kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4°C oraz 20°C.....	85
Tabela 22. Ciśnienie osmotyczne 5% roztworów wodnych oraz kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4°C oraz 20°C.....	86
Tabela 23. Ciśnienie osmotyczne 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, przechowywanych w temperaturze 4°C, wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników.....	87
Tabela 24. Ciśnienie osmotyczne 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, przechowywanych w temperaturze 4°C, sporządzonych z użyciem rozpuszczalników, poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia.....	88
Tabela 25. Lepkość 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4°C oraz 20°C.....	90
Tabela 26. Lepkość 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, przechowywanych w temperaturze 4°C, wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników.....	90
Tabela 27. Lepkość 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”, przechowywanych w temperaturze 4°C, wykonanych z użyciem rozpuszczalników poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia.....	90
Tabela 28. Warunki rozdziału chromatograficznego.....	93
Tabela 29. Zależność powierzchni piku od stężenia ceftazydymu w roztworach wzorcowych dla krzywej kalibracyjnej A.....	96
Tabela 30. Zależność powierzchni piku od stężenia ceftazydymu w roztworach wzorcowych dla krzywej kalibracyjnej B.....	97
Tabela 31. Zależność powierzchni piku od stężenia ceftazydymu w roztworach wzorcowych dla krzywej kalibracyjnej C.....	98
Tabela 32. Analiza regresji krzywych kalibracyjnych A, B i C ceftazydymu.....	100
Tabela 33. Zawartość ceftazydymu w preparacie Biotum.....	102
Tabela 34. Ocena specyficzności metody HPLC.....	108
Tabela 35. Granice wykrywalności i oznaczalności ceftazydymu.....	109
Tabela 36. Wyniki oceny dokładności metody oznaczania ilościowego ceftazydymu w 1% kroplach do oczu.....	111
Tabela 37. Wyniki oceny dokładności metody oznaczania ilościowego ceftazydymu w 5% kroplach do oczu.....	112
Tabela 38. Wpływ zmiany zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej na czas retencji oraz pole powierzchni piku ceftazydymu na przykładzie analizy roztworu wodnego ceftazydymu.....	114
Tabela 39. Parametry rozdziału chromatograficznego 1% i 5% kropli do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych i „przemysłowych” (wersja 4 i IV) bezpośrednio po sporządzeniu oraz w 30 dniu przechowywania kropli.....	122
Tabela 40. Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% roztworach wodnych, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C.....	125

Tabela 41.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu z ceftazydymem w wersji 1R, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C	126
Tabela 42.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu z ceftazydymem w wersji 2R, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C	127
Tabela 43.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu z ceftazydymem w wersji 3R, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C	128
Tabela 44.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu z ceftazydymem w wersji 4R, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C	129
Tabela 45.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% roztworach wodnych, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C	130
Tabela 46.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu z ceftazydymem w wersji IR, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C	131
Tabela 47.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu z ceftazydymem w wersji IIR, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C	132
Tabela 48.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu z ceftazydymem w wersji IIIR, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C	133
Tabela 49.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu z ceftazydymem w wersji IVR, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C	134
Tabela 50.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych”: 1P0 oraz 2P0, przechowywanych w temperaturze 4°C, wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników	137
Tabela 51.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych”: 3P0 oraz 4P0, przechowywanych w temperaturze 4°C, wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników	138
Tabela 52.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych”: IP0 oraz IIP0, przechowywanych w temperaturze 4°C, wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników	139
Tabela 53.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych”: IIIP0 oraz IVP0, przechowywanych w temperaturze 4°C, wykonanych z użyciem świeżo sporządzonych rozpuszczalników	140
Tabela 54.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych”: 1P6 oraz 2P6, przechowywanych w temperaturze 4°C, sporządzonych z użyciem rozpuszczalników, poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia	141
Tabela 55.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych”: 3P6 oraz 4P6, przechowywanych w temperaturze 4°C, sporządzonych z użyciem rozpuszczalników, poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia	142
Tabela 56.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych”: IP6 oraz IIP6, przechowywanych w temperaturze 4°C, sporządzonych z użyciem rozpuszczalników, poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia	143

Tabela 57. Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych”: IIP6 oraz IVP6, przechowywanych w temperaturze 4°C, sporządzonych z użyciem rozpuszczalników, poddanych uprzednio testowi przyspieszonego starzenia.....	144
Tabela 58. Zależność powierzchni pików od stężenia pirydyny w roztworach wzorcowych dla krzywej kalibracyjnej A	149
Tabela 59. Zależność powierzchni pików od stężenia pirydyny w roztworach wzorcowych dla krzywej kalibracyjnej B	150
Tabela 60. Analiza regresji krzywych kalibracyjnych A i B pirydyny	151
Tabela 61. Granice wykrywalności i oznaczalności pirydyny	153
Tabela 62. Wyniki oceny dokładności metody oznaczania ilościowego pirydyny w 1% kroplach do oczu	154
Tabela 63. Wyniki oceny dokładności metody oznaczania ilościowego pirydyny w 5% kroplach do oczu	155
Tabela 64. Stężenie pirydyny w 1% roztworach wodnych i kroplach do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych.....	158
Tabela 65. Stężenie pirydyny w 5% roztworach wodnych i kroplach do oczu z ceftazydymem w wersjach recepturowych.....	159
Tabela 66. Stężenie pirydyny w 1% i 5% kroplach do oczu z ceftazydymem w wersjach „przemysłowych”.....	160
Tabela 67. Porównanie trwałości kropli z ceftazydymem w wersjach recepturowych R oraz „przemysłowych” P0 i P6	188

X SPIS RYCIN

Ryc. 1.	Struktura cefemu	12
Ryc. 2.	Kwas 7- aminocefalosporanowy	12
Ryc. 3.	Wzór ogólny półsyntetycznych cefalosporyn	13
Ryc. 4.	Wzór strukturalny pięciowodzianu ceftazydymu	17
Ryc. 5.	Sugerowane mechanizmy rozkładu ceftazydymu w roztworach wodnych.....	30
Ryc. 6.	Pirydyna	37
Ryc. 7.	Boran fenylortęciowy.....	41
Ryc. 8.	Alkohol β -fenyloetylowy	42
Ryc. 9.	Alkohol poliwinylowy	43
Ryc. 10.	Krople do oczu z ceftazydymem bezpośrednio po sporządzeniu.....	75
Ryc. 11.	Zmiany zabarwienia 1% kropli (przykładowa wersja IR) w trakcie przechowywania w temperaturach 4°C i 20°C.....	91
Ryc. 12.	Zmiany zabarwienia 5% kropli (przykładowa wersja IR) w trakcie przechowywania w temperaturach 4°C i 20°C.....	92
Ryc. 13.	Krzywa kalibracyjna A ceftazydymu.....	96
Ryc. 14.	Krzywa kalibracyjna B ceftazydymu	97
Ryc. 15.	Krzywa kalibracyjna C ceftazydymu	98
Ryc. 16.	Widmo UV ceftazydymu w zakresie długości fali 200 - 400 nm	103
Ryc. 17.	Chromatogram roztworu wzorca ceftazydymu (CRS) o stężeniu w próbce badanej (w nastrzyku) 0,1 mg/ml	104
Ryc. 18.	Chromatogram roztworu Biotum o stężeniu ceftazydymu w próbce badanej (w nastrzyku) 0,1 mg/ml	104
Ryc. 19.	Chromatogram roztworu Biotum z dodatkiem wzorca	104
Ryc. 20.	Chromatogram roztworu cytrynianu sodu o stężeniu w próbce badanej (w nastrzyku) 0,3 mg/ml	105
Ryc. 21.	Chromatogram roztworu kwasu cytrynowego o stężeniu w próbce badanej (w nastrzyku) 0,015 mg/ml	105
Ryc. 22.	Chromatogram roztworu alkoholu poliwinylowego o stężeniu w próbce badanej (w nastrzyku) 0,3 mg/ml	105
Ryc. 23.	Chromatogram roztworu boranu fenylortęciowego o stężeniu w próbce badanej (w nastrzyku) 0,1 μ g/ml	106
Ryc. 24.	Chromatogram roztworu alkoholu β -fenyloetylowego o stężeniu w próbce badanej (w nastrzyku) 0,04 mg/ml	106
Ryc. 25.	Widmo UV alkoholu β -fenyloetylowego w zakresie długości fali 200 – 400 nm	106
Ryc. 26.	Chromatogram roztworu wzorcowego pirydyny o stężeniu w próbce badanej (w nastrzyku) 0,01 mg/ml	107
Ryc. 27.	Widmo UV pirydyny w zakresie długości fali 200 – 400 nm.....	107

Ryc. 28.	Chromatogram 1% kropli z ceftazydymem w wersji recepturowej 4R bezpośrednio po sporządzeniu (dzień 0)	116
Ryc. 29.	Chromatogram 1% kropli z ceftazydymem w wersji recepturowej 4R, przechowywanych w temperaturze 4°C (dzień 30).....	116
Ryc. 30.	Chromatogram 1% kropli z ceftazydymem w wersji recepturowej 4R, przechowywanych w temperaturze 20°C (dzień 30).....	116
Ryc. 31.	Chromatogram 5% kropli z ceftazydymem w wersji recepturowej IVR bezpośrednio po sporządzeniu (dzień 0)	117
Ryc. 32.	Chromatogram 5% kropli z ceftazydymem w wersji recepturowej IVR, przechowywanych w temperaturze 4°C (dzień 30).....	117
Ryc. 33.	Chromatogram 5% kropli z ceftazydymem w wersji recepturowej IVR, przechowywanych w temperaturze 20°C (dzień 30).....	117
Ryc. 34.	Chromatogram 1% kropli z ceftazydymem w wersji „przemysłowej” 4P0, bezpośrednio po sporządzeniu (dzień 0)	118
Ryc. 35.	Chromatogram 1% kropli z ceftazydymem w wersji „przemysłowej” 4P0, przechowywanych w temperaturze 4°C (dzień 30).....	118
Ryc. 36.	Chromatogram 5% kropli z ceftazydymem w wersji „przemysłowej” IVP0, bezpośrednio po sporządzeniu (dzień 0)	119
Ryc. 37.	Chromatogram 5% kropli z ceftazydymem w wersji „przemysłowej” IVP0, przechowywanych w temperaturze 4°C (dzień 30).....	119
Ryc. 38.	Chromatogram 1% kropli z ceftazydymem w wersji „przemysłowej” 4P6, bezpośrednio po sporządzeniu (dzień 0)	120
Ryc. 39.	Chromatogram 1% kropli z ceftazydymem w wersji „przemysłowej” 4P6, przechowywanych w temperaturze 4°C (dzień 30).....	120
Ryc. 40.	Chromatogram 5% kropli z ceftazydymem w wersji „przemysłowej” IVP6, bezpośrednio po sporządzeniu (dzień 0)	121
Ryc. 41.	Chromatogram 5% kropli z ceftazydymem w wersji „przemysłowej” IVP6, przechowywanych w temperaturze 4°C (dzień 30).....	121
Ryc. 42.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% roztworach wodnych i kroplach w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4°C	135
Ryc. 43.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% roztworach wodnych i kroplach w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 20°C	135
Ryc. 44.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% roztworach wodnych i kroplach w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4°C	136
Ryc. 45.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% roztworach wodnych i kroplach w wersjach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 20°C	136
Ryc. 46.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu w wersjach przemysłowych” P0, przechowywanych w temperaturze 4°C.....	145
Ryc. 47.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 1% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych” P6, przechowywanych w temperaturze 4°C	145
Ryc. 48.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych” P0, przechowywanych w temperaturze 4°C	146

Ryc. 49.	Zmiany zawartości ceftazydymu w 5% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych” P6, przechowywanych w temperaturze 4°C	146
Ryc. 50.	Krzywa kalibracyjna A pirydyny	149
Ryc. 51.	Krzywa kalibracyjna B pirydyny	150