



Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej  
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu

Agnieszka Dołhań

**Ocena trwałości wybranych cefalosporyn do użytku  
weterynaryjnego**

Rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych

Promotor: prof. zw. dr hab. Anna Jelińska

Poznań 2014

Słowa kluczowe: ceftiofur sodu,  
siarczan cefkwinomu,  
HPLC,  
trwałość w roztworach wodnych,  
trwałość w fazie stałej,  
parametry kinetyczne i termodynamiczne

*Składam serdeczne podziękowania*

***Pani prof. zw. dr. hab. Annie Jelińskiej***

*za umożliwienie wykonania rozprawy doktorskiej  
w milej atmosferze, cenne wskazówki podczas pisania pracy,  
za cierpliwość, nieprzeciętne zaangażowanie w moją pracę  
oraz pomoc w prowadzeniu badań i opracowaniu wyników.*

***Koleżankom i Kolegom***

*z Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej  
za miłą atmosferę w trakcie badań  
oraz wszelką pomoc*



*Pracę tę dedykuję Moim Rodzicom  
w podziękowaniu za trud włożony w moją edukację,  
wsparcie, miłość oraz nieustającą wiarę w moje możliwości.*

*Dziękuję również moim Przyjaciołom za wiarę i wsparcie.*



# SPIS TREŚCI

---

<b>1. Wstęp</b>	9
<b>2. Część teoretyczna</b>	13
2.1. Cefalosporyny – wiadomości ogólne	13
2.1.1. Budowa chemiczna	14
2.1.2. Mechanizm działania antybiotyków cefalosporynowych	16
2.1.3. Mechanizmy oporności na antybiotyki cefalosporynowe	17
2.1.4. Działania niepożądane antybiotyków cefalosporynowych	19
2.2. Cefalosporyny stosowane w medycynie weterynaryjnej	22
2.3. Problemy współczesnej antybiotykoterapii weterynaryjnej	23
2.4. Charakterystyka wybranych cefalosporyn stosowanych w medycynie	24
2.4.1. Ceftiofur sodowy	24
2.4.2. Siarczan cefkwinomu	26
2.5. Metody oceny jakości antybiotyków cefalosporynowych	28
2.5.1. Metody farmakopealne	29
2.5.2. Metody nefarmakopealne	32
2.6. Stan badań trwałości wybranych alkoksyliminocefalosporyn	36
2.6.1. W roztworach wodnych	36
2.6.2. W fazie stałej	37
<b>3. Cel pracy</b>	41
<b>4. Część doświadczalna</b>	43
4.1. Substancje do badań	43
4.2. Odczynniki	43
4.3. Aparatura i sprzęt pomiarowy	44
4.4. Metody analityczne stosowane w ocenie trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu	45
4.5. Wyznaczanie wartości pKa siarczanu cefkwinomu metodą miareczkowania potencjometrycznego	50
4.6. Ocena trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w roztworach wodnych	50
4.6.1. Warunki badań kinetycznych	50
4.6.2. Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu	52
4.7. Ocena trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach do iniekcji	74

4.8.	Ocena trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w fazie stałej.....	78
4.8.1.	Ocena trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu testem przyspieszonego starzenia .....	78
4.8.2.	Parametry kinetyczne reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu .....	78
<b>5.</b>	<b>Omówienie wyników .....</b>	<b>89</b>
<b>6.</b>	<b>Wnioski.....</b>	<b>113</b>
<b>7.</b>	<b>Streszczenie .....</b>	<b>115</b>
	<b>Summary .....</b>	<b>117</b>
<b>8.</b>	<b>Piśmiennictwo .....</b>	<b>119</b>



# 1. WSTĘP

---

Choroby o etiologii bakteryjnej stanowiły i nadal stanowią jedno z największych wyzwań medycyny i farmakoterapii. Epidemie nękające ludzkość od zarania dziejów, w przeciągu krótkiego czasu, potrafiły pochłonąć setki tysięcy, a nawet miliony ofiar. Dzięki rozwojowi medycyny, poprawie warunków sanitarnych czy zwiększeniu świadomości ludzi w zakresie dbania o higienę, dziś większość tych chorób możemy leczyć, bądź skutecznie im zapobiegać.

Pojęcie chemioterapii do lecznictwa wprowadził niemiecki chemik i bakteriolog, Paul Ehrlich. Jest to nauka traktująca przede wszystkim o zwalczaniu chorób wywołanych przez drobnoustroje i pasożyty oraz chorób nowotworowych. Chemioterapeutykiem więc, nazywamy substancję, która w odpowiednich warunkach powoduje uszkodzenie lub śmierć drobnoustroju, jednocześnie nie wykazując toksyczności dla ludzi czy zwierząt [1].

Milowym krokiem w walce z drobnoustrojami było odkrycie sulfonamidów. Dokonał tego w 1939 roku niemiecki chemik, Gerhard Domagk. Zbadał on skuteczność czerwonego barwnika (*Prontosil rubrum*) w leczeniu infekcji paciorkowcowych, takich jak gorączka poporodowa. Dzięki temu odkryciu odsetek umieralności na skutek zakażeń połogowych w londyńskich szpitalach w owym czasie, zmalał z 20% do 4,7%. Substancja ta znalazła również zastosowanie w leczeniu rzeżączki, meningokokowym zapaleniu opon mózgowych czy zakażeniach pneumokokami [2, 3].

Niewątpliwie największym odkryciem, dającym początek „erze antybiotyków” było odkrycie penicyliny przez szkockiego bakteriologa i lekarza, Aleksandra Fleminga. W roku 1928 zaobserwował on zahamowanie wzrostu kolonii bakterii w hodowlach nadkażonych niebieską pleśnią. Dalsze obserwacje pozwoliły stwierdzić, że pleśń hamuje rozwój paciorkowców, gronkowców, maczugowców błonicy czy laseczek wąglika. Tajemniczą pleśnią okazał się *Penicillium notatum*, a przesącz z niej Fleming nazwał

penicyliną. Za to odkrycie został on uhonorowany nagrodą Nobla. Nie udało mu się jednak wyodrębnić substancji czynnej, odpowiedzialnej, za tak spektakularne jak na owe czasy efekty. Dokonali tego dopiero blisko 10 lat później naukowcy z Uniwersytetu w Oxfordzie, profesor Howard Walter Florey oraz doktor Ernst Boris Chain. Penicylina została wprowadzona do lecznictwa w 1942 roku, a już rok później trafiła do masowej produkcji, pierwotnie głównie na potrzeby armii.

Termin antybiotyki do lecznictwa wprowadził laureat nagrody Nobla Selman Waksman, odkrywca streptomycyny (1943 roku) i neomycyny (1949 roku). Pierwotnie oznaczał on substancję pochodzenia naturalnego, wytworzoną przez drobnoustroje. Obecnie termin ten obejmuje nie tylko związki naturalne, ale i syntetyczne pochodne [4,5].

W 1945 roku profesor Wydziału Higieny Uniwersytetu w Cagliari na Sardynii, Giuseppe Brotzu, zaobserwował iż endemiczny dur brzuszny wywołany przez pałeczki *Salmonella typhi*, nie występuje u mieszkańców Cagliari. Po wyizolowaniu z zanieczyszczonych wód zatoki su Siccu, grzyba *Cephalosporium acremonium*, dostrzegł, iż jego metabolity hamują wzrost *Salmonella typhi*, *paratyphi* i *Vibro cholerae*. Dalsze badania nad cefalosporynami zostały zlecone zespołowi pod przewodnictwem Edwarda Abrahama oraz Guy`a Newtona. Badacze ci, w 1953 roku wyizolowali cefalosporynę C, jednak ze względu na niewystarczającą stabilność, nie znalazła ona zastosowania klinicznego. Dopiero w 1961 roku otrzymano m.in. kwas 7-aminocefalosporanowy, stanowiący podstawę do otrzymywania kolejnych pochodnych, o korzystniejszych parametrach.

Pierwszą cefalosporyną, wprowadzoną do lecznictwa była cefalorydyna (rok 1962), dwa lata później pojawiła się cefalotyna produkowana przez firmę Eli Lillu oraz Glaxo [5]. Do roku 1972 odkryto ponad 30 antybiotyków, zarówno naturalnych, półsyntetycznych, jak i syntetycznych. W kolejnych latach, nie tylko odkrywano zupełnie nowe leki z tej grupy, ale również modyfikowano już wprowadzone do lecznictwa pochodne.

Antybiotyki mogą działać bakteriobójczo (niszczą drobnoustroje), lub bakteriostatycznie (hamują namnażanie, ale ich nie zabijają). Ze względu na mechanizm działania chemioterapeutyki możemy podzielić na:

- hamujące syntezę ściany komórkowej bakterii: antybiotyki  $\beta$ -laktamowe i glikopeptydowe, cykloseryna, wankomycyna, teikoplanina, nowobiocyna

- upośledzające czynność błony komórkowej poprzez zmiany jej przepuszczalności dla elektrolitów oraz hamujące jej biosyntezę: polimiksyne, aminoglikozydy, nystatyna, amfoterycyna B
- blokujące syntezę białek: aminoglikozydy, makrolidy, tetracykliny i inne
- hamujące biosyntezę kwasów nukleinowych: ryfamycyna, sulfonamidy, flucytozyna
- inhibitory gyrazy (kwas nalidyksowy, fluorochinolony)

Inne kryterium podziału stanowi budowa chemiczna. Wyróżniamy tu m.in. antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, tetracykliny czy aminoglikozydy. Jest to rozpowszechniony podział, jednak z ograniczoną wartością kliniczną w stosunku do opartego na mechanizmie działania [5-7].

Warto również wspomnieć o podziale ze względu na zakres działania chemioterapeutyków:

- antybiotyki standardowe (podstawowe), o szerokim zakresie działania (penicyliny, cefalosporyny, chloramfenikol, streptomycyna, tetracykliny)
- antybiotyki pomocnicze, działające na bakterie Gram-ujemne (neomycyna, gentamycyna, kanamycyna)
- antybiotyki specyficzne, stosowane wybiórczo w określonych typach schorzeń (przeciwgruźlicze, przeciwgrzybicze, itp.).

Największym problemem współczesnej antybiotykoterapii, zarówno u ludzi, jak i u zwierząt, jest narastająca oporność bakterii na stosowane leki. Stawia to przed badaczami nowe wyzwania w zakresie nowych form antybiotyków, nowoczesnych formułacji zwiększających biodostępność i poprawiających profil terapeutyczny, jak również wprowadzania do lecznictwa terapii skojarzonych. W przypadku antybiotykoterapii weterynaryjnej, szczególnie w odniesieniu do zwierząt hodowlanych, pojawia się kolejny problem, jakim są pozostałości leków i ich metabolitów, w tkankach jadalnych zwierząt rzeźnych, jajach czy mleku. Dlatego tak istotne są dobrze opracowane metody analityczne wykorzystywane w ocenie jakości leków, jak i procedury zapewniające bezpieczeństwo konsumentów i osób pracujących przy hodowli.



## 2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

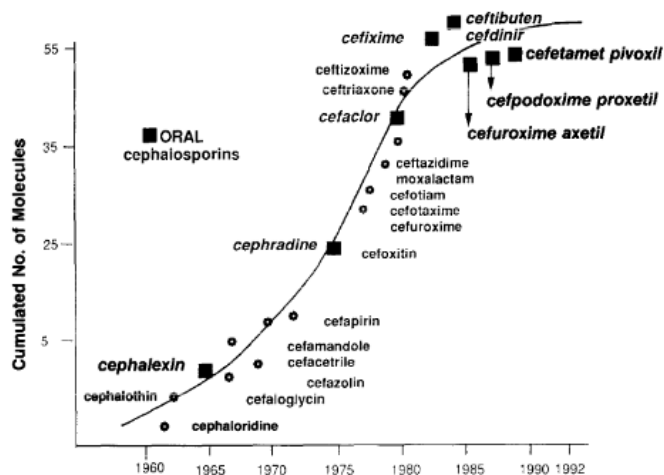
---

### 2.1. Cefalosporyny – wiadomości ogólne

Cefalosporyny należą do grupy antybiotyków  $\beta$ -laktamowych. Historia odkrycia cefalosporyn ma swój początek w 1945 roku, kiedy to włoski mikrobiolog Giuseppe Brotsu z Sardynii dokonał posiewu wody morskiej pobranej z ujścia kanału znajdującego się w sąsiedztwie. Powodem tego były jego przypuszczenia, że znajdują się w niej drobnoustroje zwalczające chorobotwórcze bakterie jelitowe. W ten sposób prof. Brotsu wyizolował szczep grzyba z gatunku *Cephalosporium acremonium* (*Acremonium chrysogenum*), a po nawiązaniu współpracy z Florey'em, w 1948 r. odkrył, że badany szczep grzyba wytwarza aż 7 antybiotyków. Było to 5 odmian cefalosporyny P, cefalosporyna N oraz cefalosporyna C, która stała się źródłem wszystkich obecnie stosowanych antybiotyków cefalosporynowych [7-9].

Cechą cefalosporyny C, która wzbudzała największe zainteresowanie, była duża oporność na penicylinazę gronkowcową i hydrolizę w środowisku kwasowym (wśród antybiotyków o podobnej budowie), przy zaledwie 10% aktywności biologicznej penicyliny. Ponadto okazała się mało toksyczna i wykazywała skuteczność terapeutyczną u badanych myszy [7-9]. Naturalne cefalosporyny (cefalosporyna C, N, P) wykazują niską aktywność, dlatego nie znalazły zastosowania w leczeniu, natomiast cefalosporyny półsyntetyczne, o udowodnionych właściwościach terapeutycznych stosuje się w leczeniu do dziś. Otrzymuje się je z kwasu 7-aminocefalosporanowego, pochodzącego z naturalnej cefalosporyny C [7-9]. Cefalosporyna C nie ma znaczenia w terapii, jednak stanowi zasadniczy surowiec do otrzymywania półsyntetycznych pochodnych.

Cefamycyny, pochodne 7 $\alpha$ -metoksyłowe, są produktami metabolizmu promieniowców z rodzaju *Streptomyces* i *Nocardia*. Największy rozwój cefalosporyn zanotowano w latach 80-tych i 90-tych ubiegłego wieku (Rycina 1).

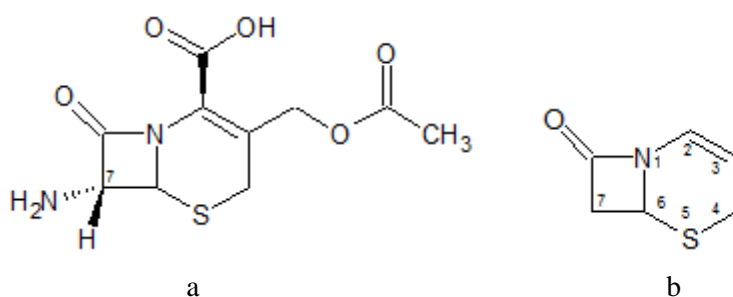


Rycina 1. Historia odkryć cefalosporyn [10].

Cefalosporyny charakteryzują się niską toksycznością, wynikającą z ich mechanizmu działania, jak również szerokim spektrum działania przeciwbakteryjnego. Jednakże bakterie wyposażone w naturalne mechanizmy obronne, umożliwiające im nabywanie oporności poprzez wytwarzanie  $\beta$ -laktamaz, stanowią pewne ograniczenia w stosowaniu cefalosporyn.

### 2.1.1. Budowa chemiczna

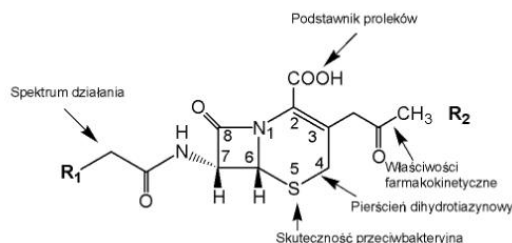
Podstawą budowy cefalosporyn jest układ  $\Delta_2$ -cefemu, będący układem  $\beta$ -laktamowo-dihydrothiazynowym (Rycina 2).



Rycina 2. Kwas 7-aminocefalosporynowy (a) i  $\Delta_2$ -cefem (b) [7].

Podobnie jak w przypadku penicylin, obecność wiązania  $\beta$ -laktamowego jest niezbędna dla aktywności biologicznej. Na jego trwałość wpływa wiązanie podwójne między  $C_2$  i  $C_3$ , które łącznie z podstawnikiem  $R_2$  (powoduje wzrost elektroujemności wiązania  $\Delta_2$ ) wywiera efekt indukcyjny na wiązanie  $\beta$ -laktamowe, co ułatwia jego stabilizację rezonansową (Rycina 3). Zjawisko to jest spowodowane przekazywaniem

ładunku powodującego odszczepienie podstawnika i rozerwanie pierścienia  $\beta$ -laktamowego. Podstawnik  $R_1$  także nie pozostaje bez znaczenia w przypadku trwałości tego ugrupowania (Tabela 1) [9].



Rycina 3. Ogólna budowa cefalosporyn.

Wiązanie  $\beta$ -laktamowe jest podatne na działanie czynników chemicznych, fizycznych i enzymatycznych ( $\beta$ -laktamazy). Powstające w wyniku ich działania produkty rozkładu cefalosporyn nie wykazują działania bakteriobójczego. W wyniku podstawienia układu cefemu w czterech pozycjach powstało bardzo wiele półsyntetycznych pochodnych o zróżnicowanej aktywności przeciwbakteryjnej oraz parametrach farmakokinetycznych.

Tabela 1. Wpływ podstawników na właściwości cefalosporyn [7]

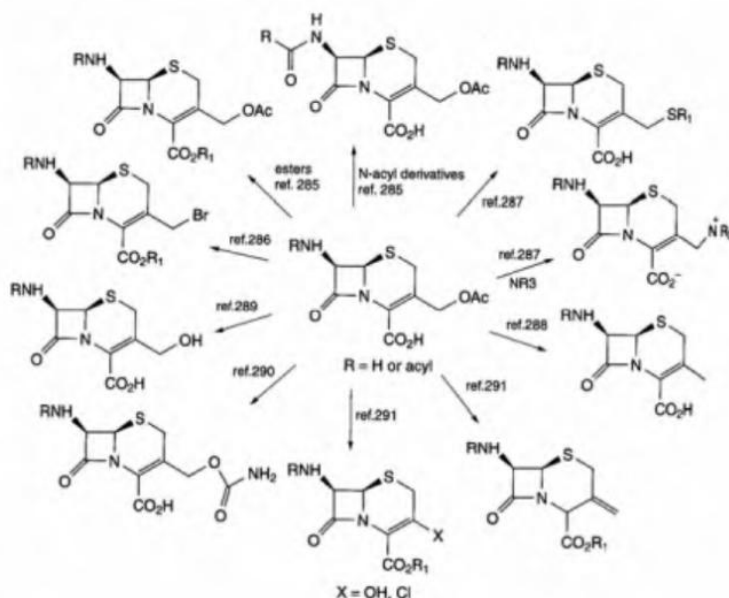
Podstawnik	Wpływ na:
R1	Aktywność przeciwbakteryjną Spektrum działania Oporność na działanie $\beta$ -laktamaz
R2	Aktywność przeciwbakteryjną Farmakokinetykę Trwałość metaboliczną
R3	Ochronę ugrupowania $\beta$ -laktamowego przed działaniem $\beta$ -laktamaz
R4	Lipofilność pochodnych (biodostępność)

Niektóre cefalosporyny występują w postaci estrów, są pro-lekami i dopiero w krążeniu wrotnym i jelicie cienkim, zostają przekształcone do aktywnych pochodnych, pod wpływem esteraz.

Do cefalosporyn możemy zaliczyć także:

- oksacefemy – w pozycji 5 zawierają zamiast atomu siarki atom tlenu

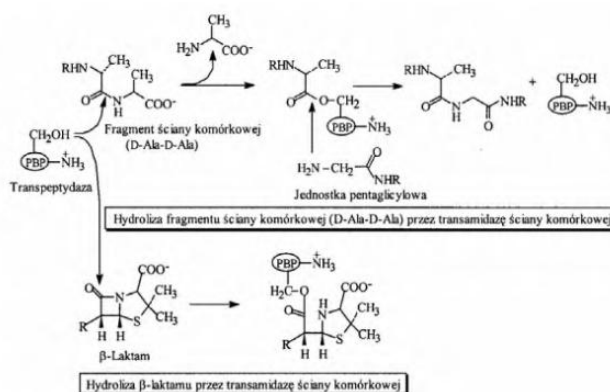
– karbacefemy – w pozycji 5 zawierają zamiast atomu siarki atom węgla [7].  
 Przykładowe modyfikacje cząsteczki kwasu 7-aminocefalosporanowego przedstawiono na rycinie 4.



Rycina 4. Przykłady chemicznych modyfikacji cząsteczki kwasu 7-aminocefalosporanowego [7].

### 2.1.2. Mechanizm działania antybiotyków cefalosporynowych

Cefalosporyny należą do antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, a te wykazują podobieństwo do dipeptydu D-alanylo-D-alaniny, będącego substratem dla transpeptydazy. Leki te wiążą się kowalentnie z centrum aktywnym enzymu i blokują go nieodwracalnie (Rycina 5)[7].



Rycina 5. Wiązanie poprzeczne ściany komórkowej bakterii i mechanizm działania antybiotyków  $\beta$ -laktamowych [7].



Białka wiążące penicyliny (PBP-Penicilin Binding Proteins) znajdują się na zewnętrznej powierzchni błony cytoplazmatycznej w różnej ilości, zależnej od rodzaju bakterii, Gram-dodatniej czy Gram-ujemnej. Związanie antybiotyku  $\beta$ -laktamowego z PBP skutkuje zahamowaniem wydłużania łańcucha peptydoglikanu oraz jego usieciowania, co w konsekwencji powoduje nagromadzenie w komórce urydyno-5'-monofosforanu (UMP) i *N*-acylowych pochodnych kwasu muraminowego, wzrost aktywności enzymów autolitycznych (m.in. hydrolazy muraminy) i unieczynnienie inhibitorów hydrolaz (kwasu lipoteichowego i substratów do biosyntezy muraminy). Autoliza uniemożliwia adhezję komórki bakteryjnej do komórki gospodarza, powoduje deformację kształtu bakterii oraz wzrost wrażliwości na działanie czynników zewnętrznych, takich jak np. ciśnienie osmotyczne. Wszystkie te procesy prowadzą do lizy komórki bakteryjnej [7-13].

### 2.1.3. Mechanizmy oporności na antybiotyki cefalosporynowe

Oporność drobnoustrojów na antybiotyki jest poważnym problemem terapii zakażeń o etiologii bakteryjnej. Bakterie zdolne do szybkiego podziału, posiadają wręcz nieograniczoną, genetyczną zdolność adaptacji do zmian środowiska. Oporność na antybiotyki to nieodwracalny proces ewolucji, będący odpowiedzią mikroorganizmów na powszechną antybiotykoterapię.

Do czynników sprzyjających narastaniu oporności na antybiotyki należą m.in. możliwość migracji bakterii pomiędzy ludźmi (duże skupiska ludności), zdolność przekazywania pomiędzy szczepami genów oporności, czy też zdolność przenoszenia genów oporności w obrębie komórki (na transpozonach).

Istnieją trzy najbardziej rozpowszechnione mechanizmy oporności jakimi bakterie mogą zmniejszać skuteczność antybiotykoterapii cefalosporynami i innymi  $\beta$ -laktamami, takie jak wytwarzanie enzymów ( $\beta$ -laktamaz, które inaktywują lek), zmiana punktu uchwytu leków (alternatywne PBP), zmiany w strukturze błony zewnętrznej, zmniejszające możliwość penetracji leku. U poszczególnych szczepów bakterii mogą występować różne kombinacje tych trzech mechanizmów oporności [14].

Mikroorganizmy, takie jak gronkowce, uwalniają duże ilości  $\beta$ -laktamaz do otaczającego je środowiska. Zdolność bakterii do obrony zależy od możliwości inaktywowania antybiotyków  $\beta$ -laktamowych zanim osiągną one punkt uchwytu, jakim są PBP. Aktywne wobec penicylin gronkowcowe  $\beta$ -laktamazy są mniej efektywne

w stosunku do większości cefalosporyn. Bakterie Gram-ujemne wytwarzają bardziej złożone enzymy, zarówno kodowane genami chromosomalnymi, jak i plazmidowymi. Enzymy te wchodzą w interakcję z wrażliwymi cefalosporynami w przestrzeni periplazmatycznej, gdzie wiążą się kowalentnie i powodują ich hydrolizę.  $\beta$ -Laktamazy bakterii Gram-ujemnych mogą być wytwarzane, gdy komórka jest ekspozycja na czynnik indukujący (często cefalosporyna). Indukcyjne  $\beta$ -laktamazy spotykane są często u *Enterobacteriace*, *P. aeruginosa* i *Citrobacter*. Klinicznie objawia się to niepowodzeniem leczenia i pojawianiem się opornych organizmów, mimo początkowej wrażliwości na różne cefalosporyny [14].  $\beta$ -Laktamazy o szerokim spektrum działania powodują oporność na ceftazydym, aztreonam oraz inne cefalosporyny [15]. Zmienność docelowego PBP obserwuje się u coraz większej liczby drobnoustrojów, np. *S. aureus*, *S. pneumoniae* czy enterokoki. Najlepiej poznany przykład to PBP 2a (znane również jako PBP 2') metycylinoopornego szczepu *S. aureus* (MRSA), który ma bardzo małe powinowactwo do antybiotyków  $\beta$ -laktamowych. PBP 2a kodowany przez gen MECA nadaje mu oporność na wszystkie antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, włączając cefalosporyny. Standardowe badania wrażliwości mogą dać błędne wyniki, sugerujące aktywność cefalosporyn wobec szczepów MRSA. Szczepy *S. aureus*, które wykazują oporność na metycylinę lub oksacylinę, są zawsze oporne również na cefalosporyny.

Trzecim wspomnianym mechanizmem oporności na cefalosporyny są zmiany w bakteriach, ograniczające wnikanie leku do miejsca działania. W przypadku cefalosporyn, aby osiągnąć PBP bakterii Gram-ujemnych, muszą one najpierw przeniknąć zewnętrzną błonę komórkową poprzez wypełnione wodą kanały, zwane porynami. W przypadku ekspozycji na niekorzystne warunki (np. obecność w środowisku leku), struktura poryn może ulegać zmianie. Skutkuje to ograniczeniem przenikalności przez błonę, np. cefalosporyn i tym samym osłabienie lub zahamowanie ich działania [16].

#### 2.1.4. Działania niepożądane antybiotyków cefalosporynowych

Najczęściej występujące działania niepożądane cefalosporyn przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Działania niepożądane związane z terapią cefalosporynami

Zespół objawów	Objaw
Związane z podaniem	Doustne: zaburzenia żołądkowo-jelitowe Dożylne: zakrzepowe zapalenie żył Domięśniowo: ból w miejscu podania
Reakcje nadwrażliwości	Wysypka grudkowo-plamista Pokrzywka Świąd Choroba posurowicza Ostra nadwrażliwość (rzadka) - anafilaksja - obrzęk naczynioruchowy Gorączka polekowa
Zmiany w obrazie krwi	Eozynofilia Trombocytopenia Odwracalna neutropenia (rzadko) Anemia hemolityczna (rzadko)
Zaburzenia hemostazy	Upośledzenie agregacji płytek Wzrost syntezy zależnych od witaminy K czynników krzepnięcia
Nefrotoksyczność	Śródmiąższowe zapalenie nerek (rzadkie)
Toksyczność w stosunku do układu pokarmowego	Nudności, wymioty Łagodny, przemijający wzrost poziomu transaminaz Indukowana ceftriaksonem kamica żółciowa Biegunka - związana ze wzrostem wydzielania wątrobowego - związana z rzekomobłoniastym zapaleniem jelita grubego wywołanym <i>Clostridium difficile</i>
Neurotoksyczność	Drgawki (rzadko) Nawracające aseptyczne zapalenie opon mózgowych (rzadko)
Disulfiramo-podobna reakcja po spożyciu alkoholu (związane z obecnością łańcucha metylotiotetrazolowego)	
Nadkażenia	
Wpływ na wyniki badań diagnostycznych	

Antybiotyki cefalosporynowe są grupą leków dobrze tolerowaną przez pacjentów. W porównaniu do innych leków przeciwdrobnoustrojowych, mają korzystny stosunek skuteczności do toksyczności. Różnice w strukturze chemicznej i farmakodynamice poszczególnych cefalosporyn wpływają na ich działania niepożądane [17-20].

Pewne działania niepożądane mogą być związane z drogą podania. Podanie doustne może powodować nudności, wymioty czy biegunkę. Zakrzepowe zapalenie żył pojawia się u 1 do 2% pacjentów, którym podawano cefalosporyny dożylnie. Efekt ten jest jednak związany, nie tyle z samymi cefalosporynami, co ze sposobem podania leku. Podanie domięśniowe może powodować ból, stąd cefalosporyny łączy się z lidokainą, co może zmniejszać uczucie dyskomfortu [21]. Nadwrażliwość, czy reakcje alergiczne występuje u 1–3% pacjentów. Najczęściej występuje wysypka, czasami połączona z gorączką, eozynofilią, bądź z jednym i drugim. Pokrzywka występuje rzadziej. Chorobę posurowiczą zgłaszano u dzieci po podaniu cefakloru czy cefprozilu. Większość tych reakcji jest łagodna i znika po zaprzestaniu podawania leków. Anafilaksja po podaniu leku występuje niezwykle rzadko (mniej niż 0,02%).

Nie istnieje żaden wiarygodny test pozwalający przewidzieć, który pacjent zareaguje alergicznie na cefalosporyny. Częstotliwość występowania alergii krzyżowej u pacjentów ze stwierdzoną alergią na penicyliny jest mało sprecyzowana. Wykazano, że 5,4 do 16,5% pacjentów z nadwrażliwością na penicyliny, jest także nadwrażliwych na cefalosporyny. Udowodniono dużo niższą częstotliwość reakcji krzyżowej, jednakże zaleca się unikanie leczenia cefalosporynami, jeżeli pacjent miał w przeszłości epizod nadwrażliwości na którąś z penicylin (IgE – pośredniczącą, anafilaksja, pokrzywka, obrzęk naczynioruchowy) [22].

Podczas leczenia cefalosporynami mogą także pojawić się zmiany w obrazie krwi. Samoistna eozynofilia może wystąpić u 4% leczonych. Trombocytopenię zgłaszano przy terapii cefalotyną, cefamandolem, cefazoliną, cefaklorem i cefoksytiną po ich kilkutygodniowym podawaniu. Są to jednak skutki odwracalne, ustępujące po zaprzestaniu podawania leku. Klinicznie nieistotny pozytywny wynik testu Coombsa może pojawić się u 3% pacjentów otrzymujących cefalosporyny. Anemia hemolityczna występuje niezwykle rzadko.

Cefalosporyny, tak jak inne leki przeciwdrobnoustrojowe, o szerokim spektrum działania, mogą powodować hipoprotrombinemię. Pochodne z łańcuchem metylotiotetrazolowym (MTT), takie jak cefamandol, cefotetan, cefoperazon czy moksalaktam zaburzają syntezę zależnych od witaminy K czynników krzepnięcia. Mogą one również wpływać na metabolizm witaminy K poprzez inny, nieznan mechanizm. U pacjentów z wysokim ryzykiem krwawień, zasadna jest więc podaż witaminy K.

Stosowane obecnie cefalosporyny rzadko są nefrotoksyczne. Opisano jednak przypadki odwracalnego zapalenia nerek łączonego z terapią antybiotykami  $\beta$ -laktamowymi [23]. Łagodny wzrost poziomu transaminaz wątrobowych występuje u ok. 1 do 7% pacjentów. Ponadto ceftriakson może tworzyć osady w żółci i drogach żółciowych, szczególnie u dzieci. Czasami wymaga to interwencji chirurgicznej [24].

Podczas terapii cefalosporynami mogą pojawić się nadkażenia mikroorganizmami opornymi. W przypadku cefalosporyn, typowymi czynnikami nadkażającymi są enterokoki, *Candida species*, *Clostridium difficile*, metycylinooporne szczepy gronkowców, *Enterobacter species* oraz inne wielolekowo oporne szczepy bakterii Gram-ujemnych.

Neurotoksyczność związana z leczeniem cefalosporynami w standardowych dawkach jest niezwykle rzadka, opisano jednakże indukowane ceftazydymem drgawki i związane z cefalosporynami nawracające aseptyczne zapalenie opon mózgowych [25].

Cefalosporyny posiadające łańcuch metylotiotetrazolowy bądź podobny strukturalnie (np. cefonicyd) mogą indukować disulfiramo–podobne reakcje po spożyciu alkoholu. Efekt ten może się utrzymywać do kilku dni po zakończeniu leczenia cefalosporynami. Objawy obejmują zaczerwienienie twarzy, tachykardię, nudności, wymioty, obfite pocenie się, duszność, hipotensję czy zmieszanie. Wzrost stężenia aldehydu octowego zwiększa siłę reakcji.

Niektóre cefalosporyny mogą wpływać na wyniki testów diagnostycznych. Cefaklor, cefadroksyl, cefamandol, cefonicyd, cefotaksym, cefoksytyna i ceftazydym mogą powodować fałszywie pozytywny cukromocz w teście Clinitest wykorzystującym technikę redukcji jonów miedzi. Cefoksytyna i cefalotyna mogą powodować fałszywie podwyższone poziomy kreatyniny w osoczu mierzonej techniką Jaffé.

## 2.2. Cefalosporyny stosowane w medycynie weterynaryjnej

Cefalosporyny stosowane u zwierząt i drogi ich podania przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Cefalosporyny stosowane u zwierząt i drogi ich podania [26-30]

Cefalosporyna	Generacja	Gatunek zwierzęcia	Droga podania
Cefaleksyna	I	Konie, psy, koty	<i>per os</i>
Cefradyna	I	Psy, koty	<i>i.m., i.v., per os,</i>
Cefadroksyl	I	Konie, psy, koty	<i>per os</i>
Cefalotyna	I	Konie Bydło Psy, koty	<i>i.v., i.m.</i> <i>s.c.</i> <i>i.m., i.v., s.c.</i>
Cefaloglicyna	I	Psy, koty	<i>per os</i>
Cefalorydyna	I	Psy, koty	<i>i.m., i.v.</i>
Cefapiryna	I	Konie Psy, koty	<i>i.m., i.v.</i> <i>i.v., i.m., s.c.</i>
Cefazolina	I	Konie Psy, koty	<i>i.v., i.m.</i> <i>i.m., i.v., s.c.</i>
Cefaklor	II	Psy, koty	<i>per os</i>
Cefoksytyna	II	Żrebięta, psy, koty	<i>i.v.</i>
Cefotetan	II	Psy, koty	<i>i.v.</i>
Cefowecyna	III	Psy, koty	<i>s.c.</i>
Cefotaksym	III	Żrebięta, kozy Psy, koty	<i>i.v.</i> <i>i.v., i.m., s.c.</i>
Ceftiofur	III	Bydło, świnie	<i>i.m.</i>
Cefkwinom	IV	Bydło, świnie	<i>i.m., i.v., s.c.</i>

*per os* – doustnie, *i.m.* – domięśniowo, *i.v.* – dożylnie, *s.c.* – podskórnice

Ze względu na wysokie koszty, terapia cefalosporynami u zwierząt ograniczona jest głównie do I i II generacji, III i IV generacja są rzadziej stosowane.

Poniżej przedstawiono zastosowanie wybranych cefalosporyn w leczeniu zwierząt [26].

- Cefaleksyna: infekcje układu oddechowego, moczowego, zakażenia gronkowcowe, zapobiegawczo przed operacjami, zabiegami.
- Cefradyna, cefadroksyl: silne działanie bakteriobójcze, stosowane w przypadku nadwrażliwości lub oporności na penicyliny.
- Cefalotyna, cefazolina: w infekcjach opornych na leczenie penicylinami, zakażenia wywołane przez *Escherichia coli*.
- Cefaklor: infekcje układu moczowego psów i kotów.

- Cefapiryna: infekcje układu moczowego, posocznice, ponadto stosowana jest jako podanie dowymieniowe u bydła mlecznego leczniczo lub w okresie zasuszenia.
- Cefoksytyna: wykazuje dużą oporność na beta-laktamazy, w infekcjach wywołanych przez *Enterobacteriaceae*, opornych na penicyliny czy cefalosporyny I generacji.
- Cefoperazon: głównie w zakażeniach wymienia bydła mlecznego przez paciorkowce, gronkowce, *Escherichia coli*.
- Cefsulodyna: zakażenia przez *Pseudomonas aeruginosa* oporne na penicyliny i gentamycynę.
- Cefowecyna: infekcje skóry, tkanek miękkich i dróg moczowych u psów i kotów [27].

Do cefalosporyn stosowanych w infekcjach wywołanych przez bakterie Gram-ujemne u gadów zalicza się cefuroksym i ceftazydym, które są podawane domięśniowo. Antybiotkami stosowanymi wyłącznie w lecznictwie weterynaryjnym są ceftiofur, cefkwinom oraz cefowecyna.

### 2.3. Problemy współczesnej antybiotykoterapii weterynaryjnej

Choroby o etiologii bakteryjnej stanowią problem terapeutyczny zarówno ludzi, jak i zwierząt. Narastająca oporność na antybiotyki to problem, z którym na co dzień spotykają się również lekarze weterynarii. Komisja Europejska zdecydowała, iż wszystkie kraje członkowskie Unii Europejskiej mają obowiązek utworzenia i zaangażowania do działania międzysektorowych zespołów, celem których będzie ustanowienie zasad monitorowania szczepów opornych. Dotyczy to zarówno medycyny człowieka, jak i medycyny weterynaryjnej. Działania mają obejmować ocenę skuteczności stosowanych antybiotyków oraz podejmowanie odpowiednio ukierunkowanych programów naprawczych. Stwierdzono, iż obecny stan spowodowany jest nadmiernym i niewłaściwym stosowaniem antybiotyków [31].

W październiku 2007 roku, Parlament Europejski przyjął wspólnotowy program działań dotyczący racjonalnego stosowania antybiotyków na lata 2008–2013, zwracając szczególną uwagę na oporność drobnoustrojów na antybiotyki i ograniczenia terapeutyczne zakażeń [32].

Sporym ograniczeniem terapii w weterynarii jest nie tylko bezpieczeństwo w odniesieniu do zwierząt, ale także bezpieczeństwo ludzi czy to pracujących w ich bezpośrednim sąsiedztwie, jak i konsumentów, w przypadku zwierząt rzeźnych.

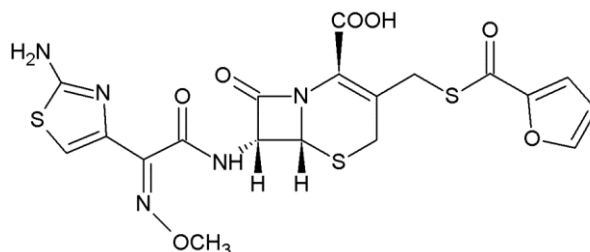
Większość antybiotyków stosowanych u zwierząt hodowlanych jest podawane z wodą lub paszą, najczęściej w wydłużonych okresach stosowania, co sprzyja wykształcaniu się oporności na podawane antybiotyki. Przy podawaniu leków tą drogą nie bez znaczenia dla powstawania oporności jest podprogowe dawkowanie, ograniczona dostępność przez niejednorodne wymieszanie z paszą oraz zmniejszone spożycie karmy przez chore zwierzęta [33].

Stosowanie antybiotyków u zwierząt gospodarskich, od których pochodzą środki spożywcze, stanowi jedno z podstawowych zagrożeń sanitarno-higienicznych, wpływających na jakość zdrowia publicznego. Najczęściej obserwuje się nabywanie oporności przez bakterie enteropatogenne, a zwłaszcza pałeczki *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp. oraz *Escherichia coli*. W celu ograniczenia rozwoju lekooporności bakterii ograniczono stosowanie antybiotyków w paszach dla zwierząt. Jako alternatywę stosowania antybiotyków zaproponowano polepszenie metod zarządzania hodowlą dużych stad, przestrzegania norm dobrostanu i stosowanie probiotyków [34-35].

Farmakoterapia zwierząt hodowlanych wiąże się z możliwością pozostania resztek związków chemicznych w tkankach zwierzęcia, czy też w jego wydzielinach. Jest to poważnym problemem, ponieważ istnieje ryzyko zatrucia, wystąpienia uczulenia lub nawet wstrząsu u osób z nadwrażliwością.

## 2.4. Charakterystyka wybranych cefalosporyn stosowanych w medycynie weterynaryjnej

### 2.4.1. Ceftiofur sodowy



Rycina 6. Ceftiofur.

Ceftiofur jest półsyntetycznym antybiotykiem, należącym do trzeciej generacji cefalosporyn. W pozycji C7 cefemu zawiera ugrupowanie alkoksyliminowe



i aminotiazolowe, warunkujące oporność na beta-laktamazy [10]. Jest on stosowany wyłącznie w leczeniu weterynaryjnym. Po raz pierwszy został zatwierdzony przez FDA (ang. *Food and Drug Administration*) w 1988 roku do leczenia chorób układu oddechowego u bydła. Obecnie jest stosowany również u trzody chlewnej, koni i drobiu. Charakteryzuje się on szerokim spektrum działania, jest aktywny wobec tlenowych bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz niektórych beztlenowców [36,37]. Ceftiofur słabo wchłania się po podaniu doustnym, dobrze po podaniu podskórnym lub domięśniowym. Silnie wiąże się z białkami osocza (ok. 70-90%) [38, 39]. Głównym metabolitem ceftiofuru jest defuryloceftiofur, o podobnej aktywności przeciwbakteryjnej, metabolizowany do disiarczków [40, 41].

Poniżej przedstawiono wskazania do stosowania ceftiofuru [37].

– Bydło:

- choroby układu oddechowego wywołane przez *Actinobacillus somnus*, *Pasteurella multocoda*, *Pasteurella haemolytica*
- stany zapalne skóry, m.in. ropowica skóry szpary międzypaznokciowej (zanokcica) spowodowane przez *Bacteroides melaninogenicus*, *Fusobacterium necrophorum*
- leczenie bakteryjnych, poporodowych infekcji macicy, wywołanych przez *Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum*

– Trzoda chlewna

- infekcje układu oddechowego, spowodowane przez *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pluropneumoniae*, *Pasteurella multocoda*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*
- stany zapalne błon surowiczych, sepsa, zapalenia wielostawowe (*Streptococcus suis*)

– Konie

- infekcje układu oddechowego wywołane przez *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus equis*
- leczenie septycznych stanów zapalnych stawów, poprzez lokalne wstrzyknięcia [38]

– Drób

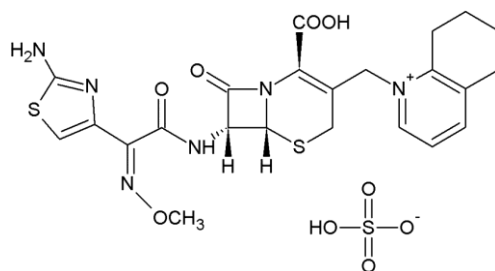
- u jednodniowych kurcząt, w infekcjach wywołanych przez *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

W Polsce ceftiofur jest dopuszczony do obrotu w podanych poniżej formułacjach [42], jako podania podskórne lub domięśniowe:

- w postaci chlorowodoru, jako zawiesina do wstrzykiwań 50 mg/ml (Ceftiomax, Ceftiocyl, Ceftiosan, Cevaxel RTU, Eficur Excenel RTU)
- w postaci soli sodowej, jako proszek do sporządzania roztworów do wstrzykiwań 50 mg/ml (Cefur, Excenel Ceftiofur, Cevaxel)

Przykładem nowych postaci leku są liposomy [43] i mikrosfery [44], które charakteryzują się przedłużonym działaniem, co przekłada się na poprawę i optymalizację leczenia, a w szczególności zapalenia wymienia u bydła mlecznego.

#### 2.4.2. Siarczan cefkwinomu



Rycina 7. Siarczan cefkwinomu.

Cefkwinom należy do czwartej generacji cefalosporyn i przeznaczony jest tylko do użytku weterynaryjnego. Podobnie do cefalosporyn trzeciej generacji, zawiera podstawnik aminotiazolowy i alkoksyliminowy w pozycji C7 cefemu, a ponadto ugrupowanie amoniowe w pozycji C3. Warunkuje to dużą aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych, oporność na  $\beta$ -laktamazy, a jego amfoteryczny charakter zapewnia dobrą przenikalność do przestrzeni periplazmatycznej komórki bakteryjnej [10]. Wykazuje działanie zarówno przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, jak i Gram-ujemnym, w tym *Pseudomonas aeruginosa*, a także *Enterobacteriaceae* wytwarzającym  $\beta$ -laktamazy typu AmpC [45]. Cefkwinom ulega słabemu wchłanianiu po podaniu doustnym, natomiast po podaniu podskórnym lub domięśniowym wchłanianie się dobrze i szybko. Po podaniu doustnym, niewielka ilość leku, przedostaje się do krążenia ogólnego.

W nieznacznym stopniu ulega metabolizmowi, wydalany jest głównie przez nerki [46].

Cefwkinom stosowany jest w leczeniu infekcji trzody chlewnej i bydła. Poniżej przedstawiono wskazania do stosowania cefwkinomu [47].

– Bydło i cielęta:

- pierwotne zakażenia płuc i górnych dróg oddechowych, wtórne infekcje przy wirusowych zapaleniach układu oddechowego (w szczególności spowodowane przez *Pasteurella multocida* i *Pasteurella heamolytica*)
- ostre stany zapalne gruczołu mlecznego (mastitis) oraz macicy (metritis) wywołane przez *Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes*, Gram-dodatnie beztlenowce [48]
- infekcje skórne: zapalenie skóry szpary międzyracicowej, zakaźna martwica opuszki racicowej, ostra nekrobacilloza skóry szpary międzyracicowej
- posocznice u cieląt spowodowane przez *Escherichia coli*

– Trzoda chlewna:

- pierwotne zakażenia płuc i górnych dróg oddechowych, wtórne infekcje przy wirusowych zapaleniach układu oddechowego
- zespół MMA: zapalenie gruczołu mlecznego (mastitis) - zapalenie macicy (metritis) - bezmleczność (agalactiae)
- u prosiąt zmniejszenie śmiertelności przy zapaleniu opon mózgowych spowodowanego przez *Streptococcus suis*
- u prosiąt w leczeniu infekcji skórnych *Staphylococcus hyicus*, stanów zapalnych stawów przebiegających z udziałem *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli*

Ponadto cefwkinom jest lekiem rezerwowym w infekcjach dolnych dróg oddechowych u koni, wywołanych przez *Streptococcus equis*, *Streptococcus zooepidemicus* oraz w przypadku posocznicy u źrebiąt (*Escherichia coli*), jako podanie dożylnie lub miejscowe w postaci aerozolu [49].

Cefwkinom w Polsce, dopuszczony jest do obrotu w podanych poniżej formułacjach [46], jako podania dożylnie, domięśniowe lub dowymieniowe:

- w postaci siarczanu, jako zawiesina do wstrzykiwań 25 mg/ml (Cobactan), 75 mg/ml (Cobactan LA 7,5%)
- w postaci siarczanu, jako proszek do sporządzania roztworów do wstrzykiwań 45 mg/ml (Cobactan 4,5%)
- w postaci siarczanu, jako maść dowymieniowa, turbostrzykawką (Cobactan LC, Virbactan)

Przeciwskazaniem do stosowania ceftiofuru i cefkwinomu jest nadwrażliwość zwierzęcia na lek lub inne antybiotyki beta-laktamowe (nadwrażliwość krzyżowa). Nie należy stosować cefkwinomu u zwierząt o masie do 1,25 kg.

Okresy karencji po zastosowaniu powyżej opisanych antybiotyków są różne, w zależności od preparatu. Określone limity pozostałości w bydlęcych tkankach jadalnych przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Dopuszczalne limity pozostałości ceftiofuru [50] i cefkwinomu [46] w tkankach bydlęcych

Ceftiofur [µg/kg]	Cefkwinom [µg/kg]	Tkanka
2000	200	Nerka
2000	100	Wątroba
200	50	Tkanka mięśniowa
600	50	Tkanka tłuszczowa
100	20	Mleko

## 2.5. Metody oceny jakości antybiotyków cefalosporynowych

Każdy produkt leczniczy dopuszczony do obrotu, musi charakteryzować się odpowiednią jakością, świadcząca o jego skuteczności działania i bezpieczeństwie stosowania. W tym celu przeprowadzane są badania potwierdzające odpowiednie kryteria jakości, takie jak: tożsamość, czystość chemiczna i mikrobiologiczna, trwałość, zawartość substancji czynnej i substancji pokrewnych, a także badania dotyczące biodostępności i biorównoważności. Oficjalnymi wydawnictwami, obowiązującymi na danych terytoriach są farmakopee, zawierające wymagania jakościowe oraz metody badań dla substancji i produktów leczniczych. Ponadto w literaturze naukowej istnieje wiele publikacji dotyczących badań bezpieczeństwa farmakoterapii u ludzi, zwierząt.

Ponadto, ze względu na metabolizm jakiemu ulegają leki, w organizmie zwierzęcia mogą powstawać toksyczne pochodne, które zgromadzone w tkankach, a następnie uwolnione w układzie pokarmowym konsumenta, przyczyniają się do oddalonych w czasie skutków, takich jak kancerogenność czy mutagenność. Z tego powodu wyznaczono wartości MRL (ang. *maximum residue limits*) określające najwyższe dopuszczalne pozostałości (NDP), limitujące poziomy leków w tkankach jadalnych i mleku. Dodatkowo hodowcy zobowiązani są przestrzegać określonych dla danego leku okresów karencji [51]. Obecnie także antybiotyki zawarte w paszach, mogą być

podawane jedynie jako pasze lecznicze, przy zachowaniu kontroli procesu ich produkcji i trwałości [52].

### 2.5.1. Metody farmakopealne

Farmakopealne metody badania cefalosporyn stosowanych w weterynarii przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Farmakopealne metody HPLC badania cefalosporyn stosowanych w weterynarii [53]

Cefalosporyna	Parametry metody	Zastosowanie metody
Cefadroksyl jednowodny	Roztwór badany: 50,0 mg substancji rozpuścić w fazie ruchomej A i uzupełnić takim samym roztworem do 50,0 ml Faza ruchoma A: roztwór buforowy fosforanowy o pH = 5,0 Faza ruchoma B: metanol Eluacja gradientowa Faza nieruchoma: kulisty żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi; 0,1 m x 4,6 mm; 5 µm Szybkość przepływu: 1,5 ml/min Detekcja: spektrofotometr UV λ = 220 nm	Oznaczenie substancji pokrewnych
	Roztwór badany: 50,0 mg substancji rozpuścić w fazie ruchomej i uzupełnić fazą ruchomą do 100,0 ml Faza ruchoma: mieszanina acetonitryl:roztwór diwodorofosforanu potasu (2,72 g/l), (4:96 V/V) Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi; 0,25 m x 4,6 mm; 5 µm Szybkość przepływu: 1,0 ml/min Detekcja: spektrofotometr UV λ = 254 nm	Oznaczenie zawartości
Cefaklor	Roztwór badany: 50,0 mg substancji rozpuścić w 10,0 ml roztworu diwodorofosforanu sodu (2,7 g/l) doprowadzonego kwasem fosforowym do pH = 2,5 Faza ruchoma A: roztwór diwodorofosforanu sodu (7,8 g/l), doprowadzony kwasem fosforowym do pH = 4,0 Faza ruchoma B: mieszanina acetonitryl:faza ruchoma A (450:550 V/V) Eluacja gradientowa Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi, związany na końcu; 0,25 m x 4,6 mm; 5 µm Szybkość przepływu: 1,0 ml/min Detekcja: spektrofotometr UV λ = 220 nm	Oznaczenie substancji pokrewnych
	Roztwór badany: 15,0 mg substancji rozpuścić w roztworze fazy ruchomej i uzupełnić takim samym roztworem do 50,0 ml Faza ruchoma: do mieszaniny (780,0 ml wody, 10,0 ml trietyloaminy i 1,0 g pentanosulfonianu sodu) dodać 220,0 ml metanolu i doprowadzić do pH = 2,5 kwasem fosforowym Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi; 0,25 m x 4,6 mm; 5 µm Szybkość przepływu: 1,5 ml/min Detekcja: spektrofotometr UV λ = 265 nm	Oznaczenie zawartości

Cefaleksyna jednowodna	Roztwór badany: 50,0 mg substancji rozpuścić w fazie ruchomej A i uzupełnić takim samym roztworem do 50,0 ml Faza ruchoma A: roztwór buforowy fosforanowy o pH = 5,0 Faza ruchoma B: metanol Eluacja gradientowa Faza nieruchoma: kulisty żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi; 0,10 m x 4,6 mm; 5 µm Szybkość przepływu: 1,5 ml/min Detekcja: spektrofotometr UV λ = 220 nm	Oznaczanie substancji pokrewnych
	Roztwór badany: 50,0 mg substancji rozpuścić w wodzie i uzupełnić wodą do 100,0 ml Faza ruchoma: mieszanina metanol:acetonitryl:roztwór diwodorofosforanu potasu (13,6 g/l):woda (2:5:10:83 V/V/V/V) Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi; 0,25 m x 4,6 mm; 5 µm Szybkość przepływu: 1,5 ml/min Detekcja: spektrofotometr UV λ = 254 nm	Oznaczanie zawartości
Cefalotyna sodowa	Roztwór badany: 75,0 mg substancji rozpuścić w wodzie i uzupełnić wodą do 25,0 ml Faza ruchoma A: mieszanina acetonitryl:roztwór wodorofosforanu dipotasu (1,742 g/l) doprowadzony do pH 2,5 kwasem fosforowym (3:97 V/V) Faza ruchoma B: mieszanina acetonitryl:roztwór wodorofosforanu dipotasu (1,742 g/l) doprowadzony do pH 2,5 kwasem fosforowym (40:60 V/V) Eluacja gradientowa Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi, związany na końcu; 0,25 m x 4,6 mm; 5 µm; temperatura 40°C Szybkość przepływu: 1,0 ml/min Detekcja: spektrofotometr UV λ = 220 nm	Oznaczanie substancji pokrewnych
	Roztwór badany: 75,0 mg substancji rozpuścić w wodzie i uzupełnić wodą do 25,0 ml Faza ruchoma: mieszanina acetonitryl:roztwór wodorofosforanu dipotasu (6,967 g/l), doprowadzony do pH 6,0 kwasem fosforowym, (14:86 V/V) Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi; 0,25 m x 4,6 mm; 5 µm Szybkość przepływu: 1,0 ml/min Detekcja: spektrofotometr UV λ = 260 nm	Oznaczanie zawartości
Cefapiryna sodowa	Roztwór badany: 42,0 mg substancji rozpuścić w fazie ruchomej i uzupełnić takim samym roztworem do 200,0 ml. Faza ruchoma: zmieszać 80,0 ml dimetyloformamidu, 4,0 ml lodowatego kwasu octowego i 20,0 ml 4,5 % (m/m) roztworu wodorotlenku potasu i uzupełnić wodą do 2000,0 ml. Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi; 0,3 m x 4,0 mm; 10 µm Szybkość przepływu: 2,0 ml/min Detekcja: spektrofotometr UV λ = 254 nm	Oznaczanie substancji pokrewnych i zawartości

Cefazolina sodowa	<p>Roztwór badany: 50,0 mg substancji rozpuścić w fazie ruchomej A i uzupełnić tym roztworem do 20,0 ml  Faza ruchoma A: roztwór zawierający 14,54 g/l wodorofosforanu disodu i 3,53 g/l diwodorofosforanu potasu  Faza ruchoma B: acetonitryl do chromatografii  Elucja gradientowa  Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi; 0,25 m x 4,0 mm; 3 µm;  temperatura 45°C  Szybkość przepływu: 1,2 ml/min  Detekcja: spektrofotometr UV <math>\lambda = 254</math> nm</p>	Oznaczenie substancji pokrewnych
	<p>Roztwór badany: 50,0 mg substancji rozpuścić w fazie ruchomej i uzupełnić fazą ruchomą do 50,0 ml  Faza ruchoma: mieszanina acetonitryl:roztwór zawierający wodorofosforanu disodu (2,77 g/l) i kwas cytrynowy (1,86 g/l) (10:90 V/V)  Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi; 0,25 m x 4,0 mm; 5 µm  Szybkość przepływu: 1,0ml/min  Detekcja: spektrofotometr UV <math>\lambda = 270</math> nm</p>	Oznaczenie zawartości
	<p>Roztwór badany: 50,0 mg substancji rozpuścić w roztworze A i uzupełnić tym roztworem do 10,0 ml  Roztwór A: 20,0 ml roztworu wodorofosforanu dipotasu (34,8 g/l), doprowadzonego do pH = 6,8 kwasem fosforowym, uzupełnić wodą do 1000,0 ml  Faza ruchoma A: woda doprowadzona do pH = 2,7 bezwodnym kwasem mrówkowym  Faza ruchoma B: acetonitryl  Elucja gradientowa  Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami fenylosililowymi; powierzchnia właściwa 300 m<sup>2</sup>/g; wielkość porów 7 nm; 0,25 m x 4,6 mm; 5 µm  Szybkość przepływu: 1,0 ml/min  Detekcja: spektrofotometr UV <math>\lambda = 235</math> nm</p>	Oznaczenie substancji pokrewnych
Cefoksytyna sodowa	<p>Roztwór badany: 25,0 mg substancji rozpuścić w wodzie i uzupełnić wodą do 25,0 ml  Faza ruchoma: mieszanina kwas octowy:acetonitryl:woda (1:19: 81 V/V/V)  Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi; 0,25 m x 4,6 mm; 5 µm  Szybkość przepływu: 1,0 ml/min  Detekcja spektrofotometr UV <math>\lambda = 254</math> nm</p>	Oznaczenie zawartości
Cefoperazon sodowy	<p>Roztwór badany (a): 25,0 mg substancji rozpuścić w fazie ruchomej i uzupełnić takim samym roztworem do 250,0 ml  Roztwór badany (b): 25,0 mg substancji rozpuścić w fazie ruchomej i uzupełnić takim samym roztworem do 50,0 ml  Faza ruchoma: mieszanina wody:acetonitrylu:kwasu octowego (60,0 g/l):roztworu octanu trietyloamoniowego (14,0 ml trietyloaminy, 5,7 ml lodowatego kwasu octowego i woda do 100,0 ml (884:110:3,5:2,5 V/V/V/V)  Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi związany na końcu; 0,15 m x 4,6 mm; 5 µm  Szybkość przepływu: 1,0 ml/min  Detekcja: spektrofotometr UV <math>\lambda = 254</math> nm</p>	Oznaczenie substancji pokrewnych i zawartości

Cefotaksym sodowy	Roztwór badany: 40,0 mg substancji rozpuścić w roztworze A i uzupełnić tym roztworem do 50,0 ml Roztwór A: mieszanina faza ruchoma B:faza ruchoma A (14:86 V/V) Faza ruchoma A: roztwór wodorofosforanu disodu (7,1 g/l), doprowadzony do pH = 6,25 kwasem fosforowym Faza ruchoma B: metanol Eluacja gradientowa Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi; 0,15 m x 3,9 mm; 5 µm; temperatura 30°C Szybkość przepływu: 1,0 ml/min Detekcja: spektrofotometr UV λ = 235 nm	Oznaczenie substancji pokrewnych i zawartości
Cefradyna	Roztwór badany: 0,3 g substancji rozpuścić w fazie ruchomej A i uzupełnić tym roztworem do 50,0 ml Faza ruchoma A: roztwór diwodorofosforanu potasu (2,72 g/l), doprowadzony do pH = 3,0 rozcieńczonym kwasem fosforowym Faza ruchoma B: metanol Eluacja gradientowa Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi; 0,15 m x 4,6 mm; 5 µm; temperatura 30°C Szybkość przepływu: 1,0 ml/min Detekcja: spektrofotometr UV λ = 220 nm	Oznaczenie substancji pokrewnych
	Roztwór badany: 50,0 mg substancji rozpuścić w roztworze buforowym fosforanowym o pH = 5 i uzupełnić tym roztworem do 100,0 ml Faza ruchoma: mieszanina metanol:roztwór buforowy fosforanowy o pH = 5,0 ( 25:75 V/V) Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi; 0,1 m x 4,6 mm; 5 µm Szybkość przepływu: 1,5 ml/min Detekcja spektrofotometr UV λ = 254 nm	Oznaczenie zawartości

## 2.5.2. Metody niefarmakopealne

Badanie żywności pochodzenia zwierzęcego przebiega dwukierunkowo. Badania kontrolno-inspekcyjne opierają się na ukierunkowanym badaniu prób, natomiast badania przesiewowe, pozwalają przekrojowo ocenić obecność pozostałości antybiotyków w losowych próbach, dlatego powinny one być tanie, charakteryzować się wysoką wydajnością i odpowiednią czułością. Dostępnych jest wiele różnych technik badawczych, które podzielono na kilka grup [54].

- Testy hamujące (mikrobiologiczne)



Jednymi z najstarszych, lecz używanymi do tej pory metodami są testy mikrobiologicznego zahamowania. Charakteryzują się one wysoką wykrywalnością, ale brakiem specyficzności. Testy te składają się z ampulek lub multi-mikroplatek zawierających pożywkę z zaszczepionym, wrażliwym na antybiotyki szczepem bakterii oraz zawierają dodatek wskaźnika pH lub red-oks. Po dodaniu badanej próby do testu z ampulką, następuje inkubacja, bakterie zaczynają się namnażać i produkować kwas, który zmienia pH środowiska reakcji i powoduje zmianę zabarwienia wskaźnika. Brak zmiany zabarwienia wskaźnika świadczy o dodatnim wyniku próby, ponieważ obecny w tkance czy mleku antybiotyk hamuje lub opóźnia rozwój bakterii. Tego typu testy są stosowane głównie jako przesiewowe metody badania mleka, ale mogą być wykorzystane również do określenia pozostałości w innych matrycach. Przykładami są m.in. testy Copan Milk Test i Delvotest SP-NT, zawierające bakterie *Stearothermophilus bacillus*, a jako wskaźnik purpurę bromokrezolową, zmieniającą zabarwienie z purpurowej na żółtą [52]. Test mikro-platek składa się z warstw agaru, zawierającego pożywkę. Próbę umieszcza się w górnej warstwie lub w studzienkach, a wzrost bakterii powoduje zmętnienie agaru. Brak zmętnienia świadczy o obecności antybiotyku, będącego inhibitorem wzrostu bakterii [55, 56].

#### – Testy enzymatyczne

Przykładem testu enzymatycznego jest test Penzym, który opiera się na reakcji DD-karboksypeptydazy z antybiotykami  $\beta$ -laktamowymi, z którymi tworzy trwały kompleks [57]. Wykonanie testu jest proste i polega na dodaniu próbki mleka do próbówki z enzymem, następnie inkubacji w temperaturze 47°C, gdzie zachodzi tworzenie kompleksu enzym-antybiotyk. Po odpowiednim czasie dodaje się tabletkę z odczynnikiem, który tworzy barwny kompleks z wolnym enzymem, a próbę poddaje się dalszej inkubacji. Test odczytuje się wizualnie, porównując zabarwienie z dołączonym do testu wzorcem barw. Brak zabarwienia lub jego mała intensywność wskazują na obecność antybiotyków beta-laktamowych. Test ten jest bardziej czuły niż testy Delvotest SP i test mikroplatek [58].

#### – Testy receptorowe

Testy mają najczęściej postać pasków testowych w odpowiednio wyprofilowanych foliach, ze studzienką do której wkrapla się próbkę. Następnie paski inkubuje się w termostacie, przez czas podany przez producenta. Odczytu dokonuje się wizualnie, porównując wielkość i intensywność linii kontrolnej i linii testowej. Zasada testu polega

na tym, że naniesiona do studzienki próbka mleka dyfunduje w podłożu docierając do miejsca, w którym znajdują się specyficzne receptory dla antybiotyków beta-laktamowych. Brak lub słabsze niż linia kontrolna zabarwienie linii testowej wskazuje na obecność pozostałości antybiotyku. Tego typu testem oznacza się często próbki mleka [59-63], ale istnieją także testy do oceny pozostałości w takich matrycach jak: mleko, sok, miód, mięso wieprzowe lub wołowe, czy jaja [64].

– Metody immunochemiczne z zastosowaniem znacznika [65]

Testy te opierają się na reakcji antygen-przeciwciała. Aby oznaczyć obecność danej substancji, należy wytworzyć odpowiednie przeciwciała przeciwko danemu antygenowi. W tym celu używa się zwierząt laboratoryjnych, takich jak myszy, króliki czy świnki morskie. Wytworzone przeciwciała mogą posiadać charakter monoklonalny, identyczny immunochemicznie, wówczas wiążą się tylko z jednym miejscem (epitopem) danego antygeny, lub poliklonalny, różny immunochemicznie, wiążąc się z wieloma epitopami antygeny. Testami immunochemicznymi można wykryć pozostałości leku, rzędu pikogram-nanogram/ml. Testy dzieli się na metody radioimmunologiczne (RIA), immunoenzymatyczne (EIA), fluorescencyjne (FIA) oraz chemiluminescencyjne. W oznaczaniu pozostałości cefalosporyn, najczęściej stosowane są metody immunoenzymatyczne, gdzie następuje sprzężanie antygeny z enzymem, a pomiar produktu tej reakcji jest miernikiem ilościowym. Produkt jest najczęściej barwny, mierzony ilościowo przy użyciu metod spektroskopowych. Przykładem jest badanie pozostałości w mleku pięciu cefalosporyn stosowanych u zwierząt z wykorzystaniem monoklonalnych przeciwciał [66] lub poliklonalnych, jak w wypadku badania pozostałości cefkwinomu w mleku po leczeniu mastitis [67].

– Metody potwierdzające przy wykorzystaniu technik chromatograficznych z odpowiednio sprzężonym detektorem

Ze względów finansowych i konieczności przeprowadzenia przez wykwalifikowany personel, nie są to metody stosowane w badaniach przesiewowych. Z technik chromatograficznych wykorzystywane są przede wszystkim metody z użyciem chromatografii cieczowej: HPLC i UPLC, najczęściej sprzężone z detektorem fotodiodowym UV [68-75]. Podstawą każdego badania jest odpowiednie przygotowanie próbki. Analiza chromatograficzna dostarcza nam następujących informacji: ilościowej (pole powierzchni, wysokość piku), jakościowej (czas retencji). Jednakże wielkości

te zależą od rodzaju fazy, temperatury pomiaru i ulegają zmianie wraz z nimi, co może powodować problemy analityczne, szczególnie w przypadkach badania pozostałości antybiotyków w tkankach, gdy nie możemy dopasować czasów retencji lub piki nakładają się na siebie. Dlatego coraz większe zastosowanie mają techniki łączone. Przykładem są badania pozostałości cefalosporyn metodą chromatografii cieczowej, połączonej ze spektrometrią mas (LC - MS) [76]. Spektrometria mas jest metodą określania stosunku masy do ładunku cząsteczek naładowanych elektrycznie ( $m/z$ ), dostarcza informacji o masie cząsteczkowej i strukturze związku, pozwala na jego szybką identyfikację [77]. Podstawowy schemat budowy spektrometru mas obejmuje: układ wprowadzenia próbki, komorę jonizacyjną, analizator jonów, detektor jonów i rejestrator. Ważnym elementem jest komora jonizacyjna, gdyż w niej dochodzi do jonizacji i fragmentaryzacji badanych cząsteczek. Najczęściej używaną metodą jonizacji jest elektrorozpylanie (ang. *Electrospray*, ESI), gdzie ciecz z badaną substancją rozpylana jest z igły, do której przyłożono wysokie napięcie. Coraz częściej spotyka się układy zbudowane z chromatografii cieczowej połączonej z dwoma spektrometrami mas (LC-MS/MS). Pierwszy spektrofotometr rozdziela fragmenty jonów, pod względem stosunku  $m/z$  i przekazuje je do drugiego, który odpowiada za ich identyfikację. Układ ten jest określany mianem tandemowej spektrometrii mas [78]. Za pomocą tych metod można badać zarówno próbki pochodzące z mleka, jak i innych tkanek zwierzęcych [68, 78-80].

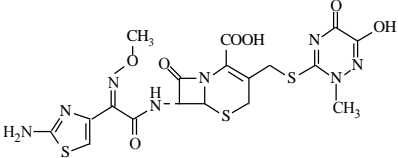
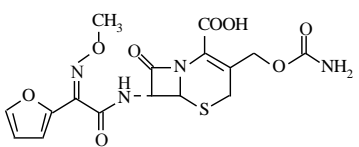
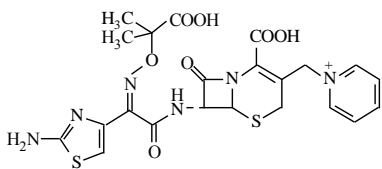
## 2.6. Stan badań trwałości wybranych alkoksyiminocefalosporyn

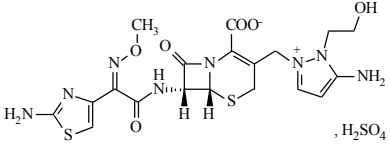
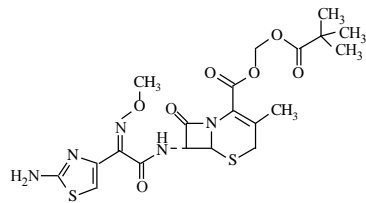
### 2.6.1. W roztworach wodnych

Badania kinetyczne reakcji hydrolizy wybranych alkoksyiminocefalosporyn obejmowały wyznaczenie:

- obserwowanych stałych szybkości reakcji rozkładu w zakresie pH 0,42 – 12,70
- wpływu rodzaju i stężenia buforu na szybkość reakcji hydrolizy
- wartości  $k_{pH}$  określających właściwą katalizę kwasowo-zasadową
- katalitycznych stałych szybkości poszczególnych reakcji cząstkowych
- profilu  $\log k = f(pH)$  i opisanie tej zależności odpowiednim równaniem kinetycznym
- parametrów termodynamicznych reakcji cząstkowych
- wpływu soli obojętnych na szybkość hydrolizy.

Poniżej przedstawiono ogólną i właściwą katalizę kwasowo-zasadową wybranych alkoksyiminocefalosporyn.

Badana cefalosporyna	Wyniki badań
<p>Ceftriakson w postaci soli disodowej [81]</p> 	<p>Efekt katalityczny – bufor fosforanowy i boranowy</p> <p>Właściwa kataliza kwasowo-zasadowa:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ hydroliza cząsteczek protonowanych katalizowana jonami wodorowymi</li> <li>▪ hydroliza spontaniczna pod wpływem wody cząsteczek protonowanych, jonów obojnych oraz mono- i dianionów</li> </ul>
<p>Cefuroksym w postaci soli sodowej [82]</p> 	<p>Efekt katalityczny – składniki buforu fosforanowego</p> <p>Właściwa kataliza kwasowo-zasadowa ugrupowania <math>\beta</math>-laktamowego:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ hydroliza niezdysonowanych cząsteczek katalizowana jonami wodorowymi</li> <li>▪ hydroliza spontaniczna pod wpływem wody cząsteczek niezdysonowanych i zdysonowanych</li> </ul> <p>Właściwa kataliza kwasowo-zasadowa ugrupowania karbamoilooksymetylowego:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ hydroliza spontaniczna pod wpływem wody zależna od ładunku substratu</li> </ul>
<p>Ceftazydym pięciowodny [83]</p> 	<p>Efekt katalityczny – składniki buforu fosforanowego i octanowego</p> <p>Właściwa kataliza kwasowo-zasadowa:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ hydroliza katalizowana jonami wodorowymi</li> <li>▪ hydroliza katalizowana jonami wodorotlenowymi</li> <li>▪ hydroliza spontaniczna pod wpływem wody zależna od ładunku substratu</li> </ul>

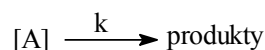
<p>Cefoseliny siarczan [84]</p> 	<p>Efekt katalityczny – składniki buforu octanowego i fosforanowego</p> <p>Właściwa kataliza kwasowo-zasadowa:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ hydroliza spontaniczna pod wpływem wody protonowanych cząsteczek, jonów obojnych oraz monoanionów cefoseliny</li> </ul>
<p>Chlorowodorek cefetamet u piwoksylu [85]</p> 	<p>Efekt katalityczny – składniki buforu fosforanowego i octanowego</p> <p>Właściwa kataliza kwasowo-zasadowa:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ hydroliza katalizowana jonami wodorowymi</li> <li>▪ hydroliza katalizowana jonami wodorotlenowymi</li> <li>▪ hydroliza spontaniczna pod wpływem wody</li> </ul>

### 2.6.2. W fazie stałej

W badaniach trwałości alkoksyliminocefalosporyn w fazie stałej określono kinetyczny mechanizm rozkładu, wyznaczono obserwowane stałe szybkości rozkładu w warunkach podwyższonej temperatury i podwyższonej wilgotności względnej powietrza, a w przypadku reakcji odwracalnych – także stałe szybkości rozkładu reakcji wprost i odwrotnej. W każdym przypadku wpływ temperatury i wilgotności względnej powietrza opisano odpowiednim równaniem kinetycznym oraz wyznaczono parametry termodynamiczne reakcji rozkładu.

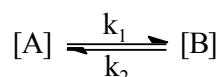
Rozkład cefalosporyn, w zależności od rodzaju pochodnej, składu preparatu i warunków przechowywania (temperatura, RH), zachodził zgodnie z równaniem:

- reakcji pierwszego rzędu



$$\ln c_i = \ln c_0 - k \cdot t$$

- odwracalnej reakcji pierwszego rzędu

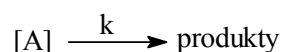


A – substrat; B – produkty

$$\ln (c_i - c_e) = \ln (c_0 - c_e) - k \cdot t,$$

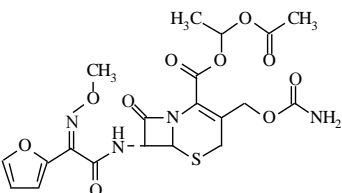
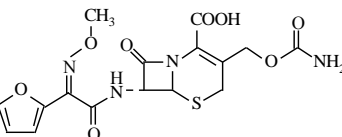
$$k = k_1 + k_2; k_2 = k/(1 + K); k_1 = k - k_2; \text{stała równowagi } K = (c_0 - c_e)/c_e$$

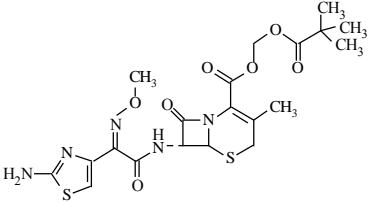
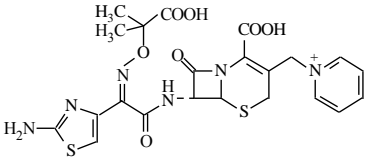
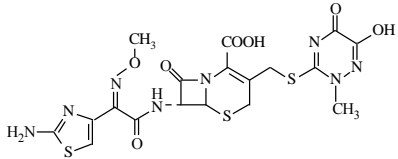
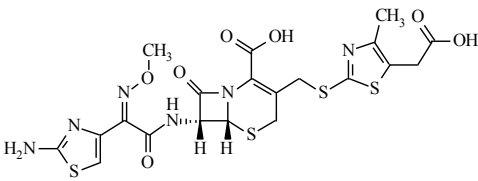
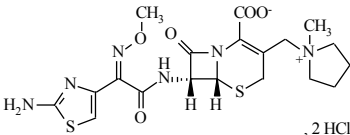
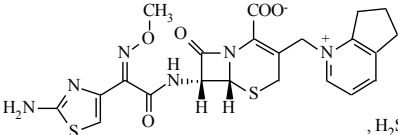
- reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu lub odwracalnej reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu



$$\ln c_t/(c_0 - c_t) = -\gamma \cdot t + c; -\gamma = k$$

Poniżej przedstawiono zestawienie modelu zachodzących reakcji w zależności od rodzaju pochodnej, postaci substancji (krystaliczna, amorficzna), rodzaju preparatu i warunków badania.

Badana cefalosporyna	Wyniki badań
<p>Cefuroksym aksetyl – forma krystaliczna i amorficzna [86-88]</p> 	<p><i>Forma krystaliczna</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>W podwyższonej temperaturze, przy podwyższonej wilgotności względnej powietrza – rozkład w wyniku reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu.</li> <li>W podwyższonej temperaturze przy RH = 0% – rozkład według równania odwracalnej reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu.</li> </ul> <p><i>Forma amorficzna</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>W podwyższonej temperaturze, przy podwyższonej wilgotności względnej powietrza – rozkład w wyniku odwracalnej reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu.</li> <li>W podwyższonej temperaturze przy RH = 0% – rozkład według równania odwracalnej reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu.</li> </ul> <p><i>Tabletki Bioracef i Zinnat</i> - w podwyższonej temperaturze, przy RH = 76% – rozkład według równania odwracalnej reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu.</p> <p><i>Zinnat – granulata do sporządzania zawiesiny</i> – w podwyższonej temperaturze, przy RH = 76% – rozkład według równania reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu.</p>
<p>Cefuroksym w postaci soli sodowej [89]</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>W podwyższonej temperaturze, przy podwyższonej wilgotności względnej powietrza oraz przy RH = 0% – rozkład według równania reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu.</li> </ul>
<p>Chlorowodorek cefetamet piovoksyli i cefetamet piovoksyl [90]</p>	<p><i>Chlorowodorek cefetamet piovoksyli</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>W podwyższonej temperaturze, przy podwyższonej wilgotności względnej powietrza – rozkład w wyniku reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu.</li> <li>W podwyższonej temperaturze przy RH = 0% – rozkład według równania reakcji pierwszego rzędu</li> </ul>

 <p style="text-align: right;">, HCl</p>	<p>względem stężenia substratu.</p> <p><i>Cefetamet pivoksyl</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>W podwyższonej temperaturze, przy podwyższonej wilgotności względnej powietrza – rozkład w wyniku reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu.</li> <li>W podwyższonej temperaturze przy RH = 0% – rozkład według równania odwracalnej reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu.</li> </ul>
<p>Ceftazydym pięciowodny [91]</p> 	<p>Ceftazydym w preparacie CEFTIM i BIOTUM</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>W podwyższonej temperaturze, przy podwyższonej wilgotności względnej powietrza oraz przy RH = 0% – rozkład według równania reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu.</li> </ul>
<p>Ceftriakson w postaci soli disodowej [92]</p> 	<p>Ceftriakson w preparacie BIOTRIAKSON i TARTRIAKSON</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>W podwyższonej temperaturze, przy podwyższonej wilgotności względnej powietrza – rozkład według równania reakcji autokatalitycznej pierwszego rzędu względem stężenia substratu.</li> <li>W podwyższonej temperaturze przy RH = 0% – rozkład według równania reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu.</li> </ul>
<p>Cefodyzym w postaci soli disodowej [93]</p> 	<p>Cefodyzym – liofilizowana substancja do iniekcji MODIVID</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>W podwyższonej temperaturze, przy podwyższonej wilgotności względnej powietrza – rozkład według równania reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu.</li> <li>W podwyższonej temperaturze, przy RH = 0% – rozkład według odwracalnej reakcji pierwszego rzędu.</li> </ul>
<p>Cefepimu dichlorowodorek jednowodny [94]</p>  <p style="text-align: right;">, 2 HCl</p>	<p>Cefepimu dichlorowodorek w preparacie MAXIPIME</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>W podwyższonej temperaturze, przy podwyższonej wilgotności względnej powietrza oraz w podwyższonej temperaturze przy RH = 0% – rozkład według równania reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu.</li> </ul>
<p>Siarczan cefpiromu [95]</p>  <p style="text-align: right;">, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>W podwyższonej temperaturze, przy podwyższonej wilgotności względnej powietrza oraz w podwyższonej temperaturze przy RH = 0% – rozkład według równania reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu.</li> </ul>





### 3. CEL PRACY

---

Jednym z podstawowych elementów kompleksowej oceny substancji leczniczych, są badania ich trwałości, opisane odpowiednimi przepisami. Celem mojej pracy była ocena trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu, cefalosporyn do użytku weterynaryjnego, w roztworach wodnych, obejmująca trwałość w roztworach o standaryzowanym pH oraz roztwory powszechnie stosowanych rozpuszczalników do iniekcji. Dodatkowo wykonano badania trwałości tych substancji w fazie stałej. Ocenę zmian stężenia badanych związków wykonano stosując metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz, z detekcją UV.

Do zrealizowania założeń celu pracy niezbędne było:

- opracowanie metod oznaczania, pozwalających na obserwację zmian stężenia substratu w obecności produktów jego rozkładu
- przeprowadzenie walidacji metod, obejmującej selektywność, liniowość, precyzję, wyznaczenie granicy wykrywalności i oznaczalności
- wykonanie badań kinetycznych, obejmujących ogólną i właściwą katalizę kwasowo-zasadową
  - wpływ stężenia jonów wodorowych
  - wpływ rodzaju i stężenia składników buforów
- zinterpretowanie:
  - ogólnej i właściwej katalizy kwasowo-zasadowej i wyznaczenie katalitycznych stałych szybkości reakcji cząstkowych
- określenie trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach do iniekcji
- określenie trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w fazie stałej

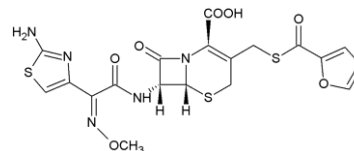


## 4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

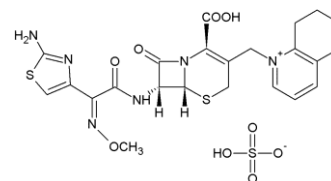
---

### 4.1. Substancje do badań

Ceftiofur sodowy (MOLEKULA, Shaftesbury, Wielka Brytania), biały, krystaliczny proszek, rozpuszczalny w wodzie, dość trudno rozpuszczalny w 1,3-propanodiolu i trudno rozpuszczalny w 1,2-propanodiolu.



Siarczan cefkwinomu (Bepfarm Ltd. Chiny) biały, krystaliczny proszek, rozpuszczalny w wodzie, trudno rozpuszczalny w etanolu, praktycznie nierozpuszczalny w eterze dietylowym i chloroformie.



### 4.2. Odczynniki

- Acetonitryl, chromatograficznie czysty; POCH Gliwice
- Kwas borowy, cz.d.a.; POCH Gliwice
- Kwas fosforowy(V), 85% cz.d.a.; POCH Gliwice
- Kwas solny, odważka analityczna; POCH Gliwice
- Disodu wodorofosforan, cz.d.a.; POCH Gliwice
- Sodu chlorek; POCH Gliwice
- Sodu wodorotlenek, odważka analityczna; POCH Gliwice
- Woda demineralizowana z aparatu do demineralizacji USF T – 801965/8903
- Roztwory płynów infuzyjnych (Tabela 6)

Tabela 6. Roztwory płynów infuzyjnych

Rodzaj roztworu	Producent	Objętość [ml]
Aqua pro injectione	Polpharma	5
0,9% Natrium Chloratum pro injectione	Polpharma	5
5% Glucosum	Baxter Terpol	250
10% Glucosum	Baxter Terpol	250
20% Glucosum	Baxter Terpol	250
5% Glucosum et 0,9% Natrium Chloratum (1:1)	Fresenius Kabi	250
5% Glucosum et 0,9% Natrium Chloratum (2:1)	Fresenius Kabi	250
Solutio Ringeri	Baxter Terpol	250
Solutio Ringeri Lactate	Fresenius Kabi	500
Płyn fizjologiczny wieloelektrolitowy izotoniczny	Fresenius Kabi	250
Płyn pediatryczny wyrównawczy	Baxter Terpol	250

#### 4.3. Aparatura i sprzęt pomiarowy

- Wysokosprawny chromatograf cieczowy HPLC Shimadzu SPD-20A Prominence UV/VIS
- Waga analityczna Stratorius BP210S
- pH-metr Mettler Toledo Seven Compact pH/ion S220
- Aparat do demineralizacji wody USF T+801965/8903, kolumna jonowymienna Seradest USF800 z węzłem połączeniowym, komorą pomiarową, konduktorem diodowym LSM i dystrybutorem
- Ultratermostat Fisherbrand FBH-612
- Titrator Mettler-Toledo DL 50 wyposażony w szklaną połączoną elektrodę Mettler-Toledo DG 111 SC
- Mieszadło REAX top 451
- Lodówka z zamrażalnikiem Polar tym TS136U wersja 638
- Igły Micropoint 1,6 × 40 mm MIFAM S.A. Milanówek, Polska
- Strzykawki 10 ml Romed, Holandia
- Stoper
- Pakiet oprogramowania MS Office

- Program ChemDraw

#### 4.4. Metody analityczne stosowane w ocenie trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinu

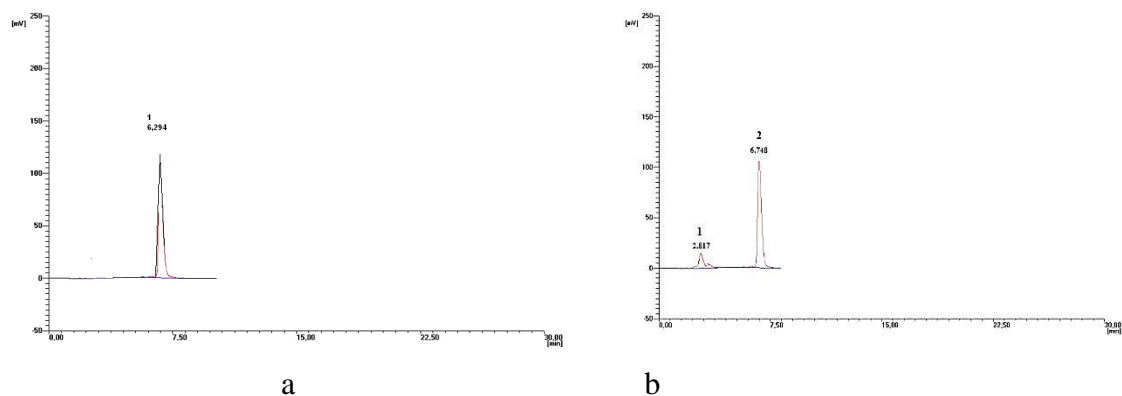
Do oznaczania zmian stężenia ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinu zastosowano metodę HPLC. Metoda do oceny trwałości ceftiofuru sodowego została opracowana przez M. J. Souza i wsp. [96], a następnie zmodyfikowana i zwalidowana w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu [97]. W przypadku siarczanu cefkwinu, parametry rozdzielania zostały opracowane w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej (Tabela 7).

Tabela 7. Metody analityczne i ich walidacja

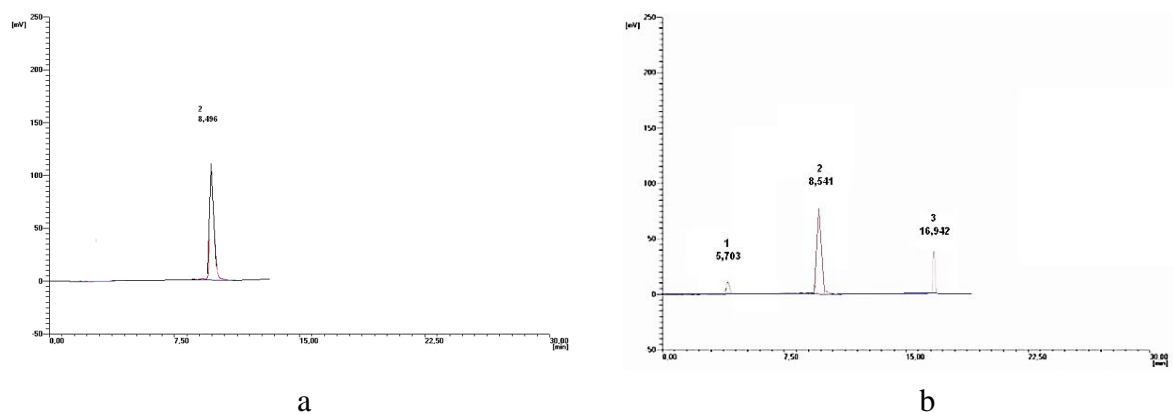
Metoda HPLC do oceny trwałości ceftiofuru sodowego w roztworach wodnych i fazie stałej	Metoda HPLC do oceny trwałości siarczanu cefkwinu w roztworach wodnych i fazie stałej
Parametry rozdzielania: <ul style="list-style-type: none"><li>• Kolumna LiChroCART (5 µm), 250 mm × 4 mm (i.d.), Merck KgA, Darmstadt Niemcy</li><li>• Faza ruchoma: 0,02 mol/l bufor fosforanowy (pH 6,0) – acetonitryl (78:22 V/V)</li><li>• Szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,0 ml/min</li><li>• Długość fali detektora UV: 292 nm</li><li>• Temperatura kolumny: 303 K</li></ul>	Parametry rozdzielania: <ul style="list-style-type: none"><li>• Kolumna LiChroCART (5 µm), 125 mm × 4 mm (i.d.), Merck Darmstadt, Niemcy</li><li>• Faza ruchoma: 0,02 mol/l bufor fosforanowy (pH 7,0) – acetonitryl (90:10 V/V)</li><li>• Szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,0 ml/min</li><li>• Długość fali detektora UV: 268 nm</li><li>• Temperatura kolumny: 303 K</li></ul>
Selektywność	
<i>Faza stała</i> Próbkę substancji badanej o masie 5,0 mg (próbki poddane rozkładowi ochłodzone do temperatury pokojowej), rozpuszczono w wodzie i przenoszono ilościowo do kolby miarowej, a następnie uzupełniono wodą do 25,0 ml (roztwór A). <i>Roztwory</i> Roztwory o odpowiednich wartościach pH i sile jonowej 0,50 mol/l termostатовano, a następnie dodawano roztwór ceftiofuru sodowego lub siarczanu cefkwinu w wodzie, stężenie badanych roztworów wynosiło 0,2 mg/ml.	
W przedziale czasu 0 – 8 min na chromatogramach obserwowano piki substancji badanej i produktów rozkładu (Rycina 8).	W przedziale czasu 0 – 20 minut na chromatogramach obserwowano piki substancji badanej i produktów rozkładu (Rycina 9).
Precyzja	
W celu określenia precyzji metody, wykonano po sześć oznaczeń próbek zawierających: 0,16 mg/ml; 0,20 mg/ml; 0,24 mg/ml substancji badanej (ceftiofur sodowy). Wyniki oznaczeń oraz ich statystyczne opracowanie przedstawiono w tabelach 8–9.	W celu określenia precyzji metody oznaczania siarczanu cefkwinu wykonano po sześć oznaczeń próbek zawierających 0,20 mg/ml substancji badanej. Wyniki oznaczeń oraz ich statystyczne opracowanie przedstawiono w tabeli 10.

Metoda HPLC do oceny trwałości ceftiofuru sodowego w roztworach wodnych i fazie stałej	Metoda HPLC do oceny trwałości siarczanu cefkwionomu w roztworach wodnych i fazie stałej
<p><i>Roztwory i wykonanie oznaczenia</i></p> <p><i>Roztwory substancji badanej.</i> Odważono 16,0 mg, 20,0 mg i 24,0 mg ceftiofuru sodowego, rozpuszczono w wodzie i uzupełniono wodą do 100,0 ml (roztwór A1 = 0,16 mg/ml, roztwór A2 = 0,20 mg/ml, roztwór A3 = 0,24 mg/ml).</p> <p><i>Wykonanie oznaczenia.</i> Na kolumnę wprowadzano po 50 µl roztworów A1-A3 i zarejestrowano chromatogramy.</p>	<p><i>Wykonanie oznaczenia:</i></p> <p><i>Roztwory substancji badanej.</i> Odważono dokładnie 20,0 mg substancji badanej, rozpuszczono w wodzie i uzupełniono wodą do 100,0 ml (roztwór A).</p> <p><i>Wykonanie oznaczenia.</i> Na kolumnę wprowadzano po 50,0 µl roztworów i zarejestrowano chromatogramy.</p>
Liniowość	
<p>Zależność <math>P_i = f(c)</math> dla ceftiofuru sodowego wyznaczono w wodzie. Przygotowano 10 roztworów o stężeniu od 0,04 mg/ml do 0,30 mg/ml.</p> <p><i>Roztwory i wykonanie oznaczenia</i> Odważono 10,0 mg ceftiofuru sodowego, rozpuszczono w 10,0 ml wody (roztwór A). Sporządzono 10 kolejnych stężeń roztworów ceftiofuru sodowego, a następnie nanoszono na kolumnę po 50 µl w/w roztworów i zarejestrowano chromatogramy.</p> <p>Wykonano wykres zależności <math>P_i = f(c)</math> (Tabela 11, Rycina 10)</p> <p>gdzie: <math>P_i</math> – pole powierzchni pików ceftiofuru sodowego, <math>c</math> – stężenie ceftiofuru sodowego</p>	<p>Zależność <math>P_i = f(c)</math> dla siarczanu cefkwionomu wyznaczono w wodzie. Przygotowano 10 roztworów o stężeniu od 0,04 do 0,30 mg/ml.</p> <p><i>Roztwory i wykonanie oznaczenia</i> Odważono 5,0 mg substancji badanej, rozpuszczono w wodzie i uzupełniono wodą do 10,0 ml (roztwór A). Sporządzono 10 kolejnych stężeń roztworów siarczanu cefkwionomu, a następnie nanoszono na kolumnę po 50,0 µl uzyskanych roztworów i zarejestrowano chromatogramy.</p> <p>Wykonano wykres zależności <math>P_i = f(c)</math> (Tabela 12, Rycina 11)</p> <p>gdzie: <math>P_i</math> – pole powierzchni pików siarczanu cefkwionomu, <math>c</math> – stężenie siarczanu cefkwionomu</p>
Granica wykrywalności i oznaczalności	
<p>Za granicę wykrywalności (DL) przyjęto: <math>DL = \frac{3,3 \cdot S_y}{a}</math></p> <p>Za granicę oznaczalności (QL) przyjęto: <math>QL = \frac{10 \cdot S_y}{a}</math></p>	
<p>Granica wykrywalności: 1,14 µg ceftiofuru sodowego</p> <p>Granica oznaczalności: 3,46 µg ceftiofuru sodowego</p>	<p>Granica wykrywalności: 14,02 µg siarczanu cefkwionomu</p> <p>Granica oznaczalności: 42,50 µg siarczanu cefkwionomu</p>
Zakres i czułość metody	
Określony został zakres, czyli przedział między najwyższym i najniższym poziomem zawartości oznaczonej substancji, przy którym oznaczanie prowadzone jest z odpowiednią precyzją i liniowością	
Dla zastosowanych warunków rozdzielania zakres ten wynosi od 0,04 mg/ml do 0,30 mg/ml. Miarą czułości metody jest nachylenie krzywej $y = ax$ ( $a = (3,50 \pm 0,17) \times 10^7$ ; $r = 0,9982$ ; (Rycina 10).	Dla zastosowanych warunków rozdzielania zakres ten wynosi od 0,04 mg/ml do 0,3 mg/ml. Miarą czułości metody jest nachylenie krzywej $y = ax$ ( $a = (7,65 \pm 0,26) \times 10^7$ ; $r = 0,9988$ ; Rycina 11).

## Selektywność metody



Rycina 8. Chromatogram HPLC ceftiofuru sodowego a) próbka zerowa b) poddanego działaniu 0,01 mol/l NaOH; t = 20 min (1 – produkty rozkładu substancji badanej, 2 – ceftiofur sodowy).



Rycina 9. Chromatogram HPLC siarczanu cefkwinomu a) próbka zerowa b) poddanego działaniu 0,1 mol/l NaOH; t = 5 min (1, 3 – produkty rozkładu substancji badanej, 2 – siarczan cefkwinomu).

## Precyzja metody

Tabela 8. Wyniki oznaczania roztworów A1, A2 i A3 ceftiofuru sodowego do wyznaczenia precyzji metody

0,16 mg/ml	0,20 mg/ml	0,24 mg/ml
5347551	6831263	8654170
5402936	6666071	8569949
5460251	6942249	8655467
5607095	6983250	8683704
5374121	6908576	8502182
5570609	6967191	8730073

Tabela 9. Statystyczne opracowanie wyników wyznaczania precyzji metody HPLC dla ceftiofuru sodowego

Parametr	Roztwór A <sub>1</sub>	Roztwór A <sub>2</sub>	Roztwór A <sub>3</sub>
Wartość średnia (P <sub>sr</sub> )	5460427	6883100	8632591
Wariancja (s <sup>2</sup> )	1,14 × 10 <sup>10</sup>	1,42 × 10 <sup>10</sup>	0,75 × 10 <sup>10</sup>
Odchylenie standardowe pojedynczego wyniku (s)	106908	119195	82504
Względne odchylenie standardowe (S <sub>y</sub> )	43645	48661	33682
Współczynnik zmienności W <sub>z</sub> [%]	1,96	1,73	0,95

Tabela 10. Wyniki oznaczania siarczanu cefkwinu oraz parametry statystyczne wyznaczenia precyzji metody

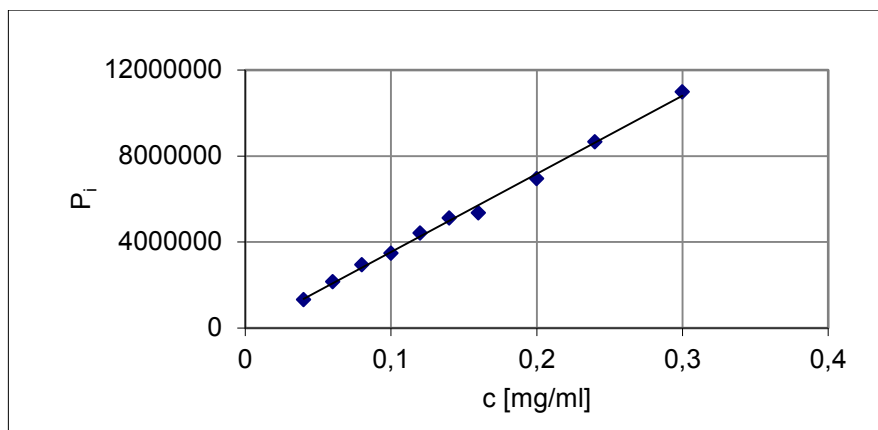
Lp.	P <sub>i</sub> CF	Parametry statystyczne	
1.	5124376	Wartość średnia P <sub>i</sub>	5055136
2.	5012976	Wariancja s <sup>2</sup>	0,26 × 10 <sup>10</sup>
3.	5013241	Odchylenie standardowe pojedynczego wyniku s	51276
4.	5060719	Względne odchylenie standardowe s <sub>y</sub>	20933
5.	5108462	Współczynnik zmienności W <sub>z</sub> [%]	1,01

### Liniowość metody

Tabela 11. Zależność P<sub>i</sub> = f(c) ceftiofuru sodowego oraz ocena statystyczna prostych y = ax + b i y = ax

Lp.	c [mg/ml]	P <sub>i</sub>	Ocena statystyczna prostych	
			y = ax + b	y = ax
1.	0,04	1306223	a = (3,64 ± 0,17) × 10 <sup>7</sup>	a = (3,5 ± 0,17) × 10 <sup>7</sup>
2.	0,06	2153184	b = (-1,0 ± 2,8) × 10 <sup>5</sup>	r = 0,9982
3.	0,08	2941699	r = 0,9982	S <sub>a</sub> = 7,2 × 10 <sup>5</sup>
4.	0,10	3465436	t <sub>b</sub> = -0,85	S <sub>y</sub> = 1,7 × 10 <sup>5</sup>
5.	0,12	4405931	S <sub>a</sub> = 7,6 × 10 <sup>5</sup>	
6.	0,14	5116902	S <sub>b</sub> = 1,2 × 10 <sup>5</sup>	
7.	0,16	5347551	S <sub>y</sub> = 1,8 × 10 <sup>5</sup>	
8.	0,20	6942249		
9.	0,24	8655467		
10.	0,30	10984891		

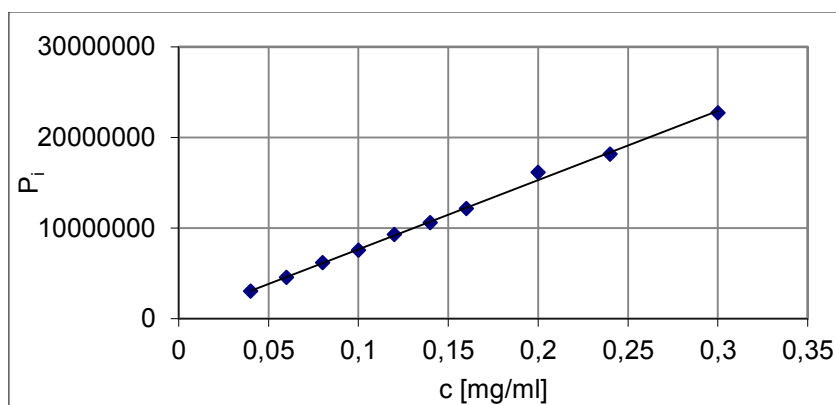




Rycina 10. Zależność  $P_i = f(c)$  dla ceftiofuru sodowego.

Tabela 12. Zależność  $P_i = f(c)$  siarczanu cefkwinomowego oraz ocena statystyczna prostych  $y = ax + b$  i  $y = ax$

Lp.	c [mg/ml]	$P_i$	Ocena statystyczna prostych	
			$y = ax + b$	$y = ax$
1.	0,04	3024105	$a = (7,64 \pm 0,28) \times 10^7$	$a = (7,65 \pm 0,26) \times 10^7$
2.	0,06	4535621	$b = (2,36 \pm 4,60) \times 10^4$	$r = 0,9988$
3.	0,08	6147412	$r = 0,9988$	$S_a = 1,23 \times 10^6$
4.	0,10	7559250	$t_b = 0,11$	$S_y = 3,06 \times 10^5$
5.	0,12	9271100	$S_a = 1,31 \times 10^6$	
6.	0,14	10582952	$S_b = 2,14 \times 10^5$	
7.	0,16	12125074	$S_y = 3,25 \times 10^5$	
8.	0,20	16124728		
9.	0,24	18154374		
10.	0,30	22684101		



Rycina 11. Zależność  $P_i = f(c)$  dla siarczanu cefkwinomowego.

#### 4.5. Wyznaczanie wartości $pK_a$ siarczanu cefkwinomu metodą miareczkowania potencjometrycznego

Pomiary pH wykonano przy użyciu aparatu Mettler-Toledo DL 50 wyposażonego w szklaną, połączoną elektrodę Mettler-Toledo DG 111 SC. Kalibrację aparatu wykonano przy użyciu wzorcowych roztworów buforowych o pH 4,01, 7,00 i 9,21 (Hamilton, Switzerland). Standardowy potencjał, nachylenie i punkt zerowy elektrody zostały ustalone zgodnie z instrukcją obsługi elektrody. Roztwory NaOH (0,1 mol/l) i HCl (0,1 mol/l) zostały ujednolicone na standaryzowanym wodoroftalanie potasu (Merck, Germany) i tris(hydroksymetylo)-aminometanie (Merck, Germany). Dejonizowaną wodę otrzymano poprzez przepuszczenie destylowanej wody przez system oczyszczania wody Millipore Simplicity UV (Waters Corporation, USA).

Roztwór siarczanu cefkwinomu przygotowano poprzez rozpuszczenie 0,120 g substancji w 40,0 ml dejonizowanej wody. Próbkę miareczkowano roztworem wodorotlenku sodu (0,1 mol/l). Miareczkowanie wykonano w zakresie pH od 2,7 do 11,5 przy stałej sile jonowej ( $\mu = 0,1$  mol/l NaCl), w atmosferze azotu, w temperaturze 295 K.

Wykonano serię trzech miareczkowań potencjometrycznych, a do wyznaczenia wartości  $pK_a$  wykorzystano metodę najmniejszych kwadratów Hyperquad [98]. Wyznaczono trzy stałe dysocjacji, odpowiadające odpowiednio:

- $pK_{a1}$  – grupy karboksylowej =  $2,7525 \pm 0,0162$
- $pK_{a2}$  – grupy aminowej w podstawniku tiazolowym =  $3,7521 \pm 0,0278$
- $pK_{a3}$  – czwartorzędowej grupy amoniowej =  $7,5410 \pm 0,0410$

#### 4.6. Ocena trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w roztworach wodnych

##### 4.6.1. Warunki badań kinetycznych

Trwałość ceftiofuru sodowego w roztworach wodnych badano w temperaturze 323 K, w zakresie pH od 0,44 – 10,07, natomiast w zakresie pH 11,94 – 13,34 (roztwory wodorotlenku sodu) obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu wyznaczono w temperaturze 288 K, 293 K i 298 K, a następnie uzyskane wyniki ekstrapolowano do temperatury 323 K.

Badania trwałości siarczanu cefkwinomu w roztworach wodnych prowadzono w temperaturze 343 K, w zakresie pH od 0,45 – 10,48. W zakresie pH 12,15 – 13,54 (roztwory wodorotlenku sodu) obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu wyznaczono w temperaturze

298 K, 303 K, 308 K i 313 K, a następnie uzyskane wyniki ekstrapolowano do temperatury 343 K.

Odpowiednie wartości pH uzyskano stosując następujące roztwory buforowe:

- kwas solny o stężeniu 0,05 mol/l do 0,5 mol/l, pH 0,44-1,39
- bufor fosforanowy ( $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ ); pH 1,54 – 2,95
- bufor octanowy ( $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_3\text{COONa}$ ); pH 3,65-5,48 (ceftiofur sodowy); pH 3,66-5,47 (siarczan cefkwinomu)
- bufor fosforanowy ( $\text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{HPO}_4^{2-}$ ); pH 5,84 – 7,25 (ceftiofur sodowy); pH 5,76–6,82 (siarczan cefkwinomu)
- bufor boranowy ( $\text{NaBO}_2 + \text{H}_3\text{BO}_3$ ); pH 7,49 – 10,07 (ceftiofur sodowy); pH 7,52–10,48 (siarczan cefkwinomu)
- roztwór wodorotlenku sodu o stężeniu od 0,01 mol/l do 0,2 mol/l; pH 11,94 – 13,57.

Siłę jonową roztworów doprowadzano do stałej wartości 0,50 mol/l przy użyciu roztworu chlorku sodu o stężeniu 4,0 mol/l. Wartości pH roztworów buforowych mierzono w temperaturze reakcji, a w przypadku roztworów kwasu solnego i wodorotlenku sodu, wartości pH obliczono z odpowiednich równań:

$$\text{pH} = -\log f_{\text{HCl}} [\text{HCl}]$$

$$\text{pH} = \text{pK}_w + \log f_{\text{NaOH}}$$

Wartości współczynników aktywności ( $f_{\text{HCl}}$  i  $f_{\text{NaOH}}$ ) zaczerpnięto z piśmiennictwa, lub otrzymano poprzez interpolację danych literaturowych [99].

Roztwory buforowe (24,0 ml) o określonej wartości pH, termostatowano w odpowiedniej temperaturze. Po ogrzaniu roztworu do temperatury badania, dodawano 1,0 ml roztworu substancji badanej (ceftiofuru sodowego lub siarczanu cefkwinomu) o stężeniu 5 mg/ml i mieszano.

W określonych odstępach czasu, zależnych od szybkości rozkładu, pobierano 1,0 ml analizowanego roztworu, który natychmiast chłodzono w wodzie z lodem. Roztwory o pH powyżej 8, doprowadzano do pH ok. 2 kwasem solnym o odpowiednim stężeniu. Na kolumnę chromatograficzną wprowadzano 50  $\mu\text{l}$  roztworu i rejestrowano piki substancji badanej i produktów rozkładu.

#### 4.6.2. Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu

Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w roztworach wodnych wyznaczono metodą HPLC z detekcją UV (Rozdział 4.4). Interpretację zmian stężenia substratu jako funkcję czasu przeprowadzono wykorzystując pole powierzchni piku ceftiofuru sodowego lub siarczanu cefkwinomu. Półlogarytmiczne wykresy  $P_i = f(t)$  dla obu związków są opisane równaniem reakcji pseudopierwszego rzędu:

$$\ln P_i = \ln P_0 - k_{\text{obs}} \cdot t$$

gdzie:

$P_0$  i  $P_i$  – pole powierzchni piku substratu w czasie  $t = 0$  i  $t_i$

$k_{\text{obs}}$  – obserwowana stała szybkości reakcji

$t$  – czas

Półlogarytmiczne wykresy zależności  $P_i = f(t)$  są prostoliniowe, a ich nachylenie jest miarą szybkości reakcji rozkładu ze znakiem ujemnym ( $-k_{\text{obs}}$ ).

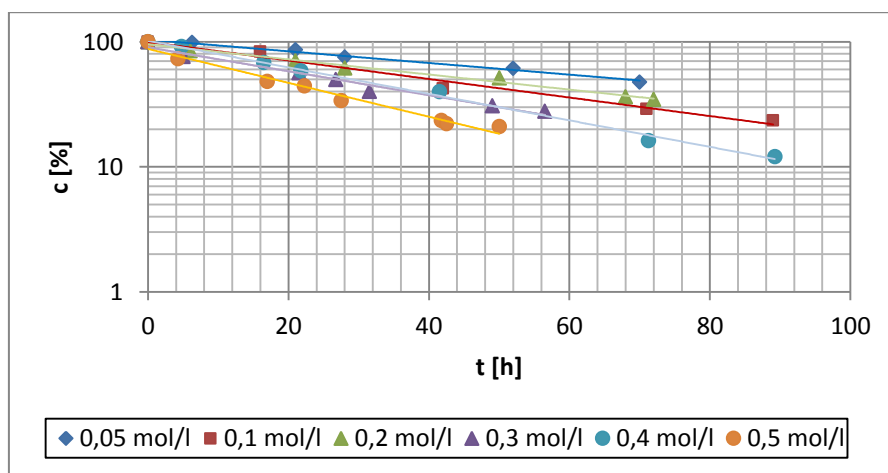
Do interpretacji w/w wykresów, obliczono metodą najmniejszych kwadratów następujące parametry równania  $y = ax + b$ :  $a \pm \Delta a$ ,  $b \pm \Delta b$ , błędy standardowe  $S_a$ ,  $S_b$ ,  $S_y$  oraz współczynnik korelacji liniowej  $r$ . Wartości  $\pm \Delta a$  i  $\pm \Delta b$  obliczono dla  $f = n - 2$  stopni swobody i  $\alpha = 0,05$ . Obliczenia przeprowadzono z użyciem arkusza kalkulacyjnego MS Excel.

Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinach 12 – 29 i w tabelach 13 – 29. Graficznie wyniki zostały przedstawione w postaci półlogarytmicznych wykresów  $c[\%] = f(t)$ .

*Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w kwasie solnym i roztworach wodorotlenku sodu*

Tabela 13. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w roztworach kwasu solnego o stężeniu 0,05 - 0,50 mol/l, w temperaturze 323 K ( $\mu = 0,50$  mol/l)

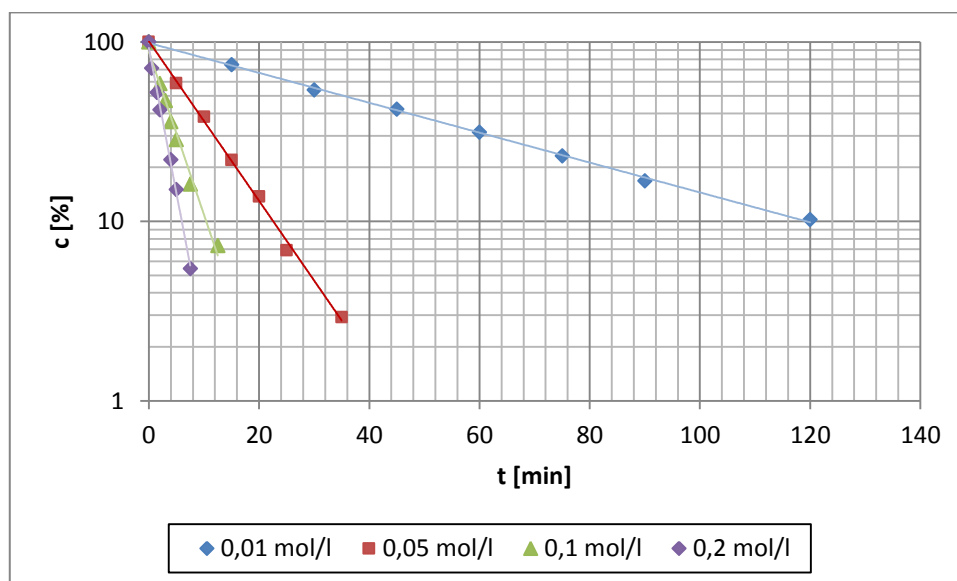
Stężenie [mol/l]	$a \pm \Delta a$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	$k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$S_a$	r	n
0,05	$-(1,07 \pm 0,17) \cdot 10^{-2}$	$(2,98 \pm 0,46) \cdot 10^{-6}$	$5,96 \cdot 10^{-4}$	-0,9939	6
0,1	$-(1,70 \pm 0,46) \cdot 10^{-2}$	$(4,74 \pm 1,27) \cdot 10^{-6}$	$1,44 \cdot 10^{-3}$	-0,9895	5
0,2	$-(1,39 \pm 0,18) \cdot 10^{-2}$	$(3,86 \pm 0,50) \cdot 10^{-6}$	$7,03 \cdot 10^{-4}$	-0,9937	7
0,3	$-(2,33 \pm 0,35) \cdot 10^{-2}$	$(6,47 \pm 0,97) \cdot 10^{-6}$	$1,35 \cdot 10^{-3}$	-0,9917	7
0,4	$-(2,44 \pm 0,19) \cdot 10^{-2}$	$(6,77 \pm 0,52) \cdot 10^{-6}$	$7,24 \cdot 10^{-4}$	-0,9978	7
0,5	$-(3,12 \pm 0,48) \cdot 10^{-2}$	$(8,67 \pm 1,32) \cdot 10^{-6}$	$1,95 \cdot 10^{-3}$	-0,9885	8



Rycina 12. Półlogarytmiczne wykresy  $c$  [%] =  $f(t)$  reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w roztworach kwasu solnego, o stężeniu 0,05 – 0,50 mol/l, w temperaturze 323 K.

Tabela 14. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w roztworach wodorotlenku sodu o stężeniu 0,01 - 0,20 mol/l, w temperaturze 288 K ( $\mu = 0,50$  mol/l)

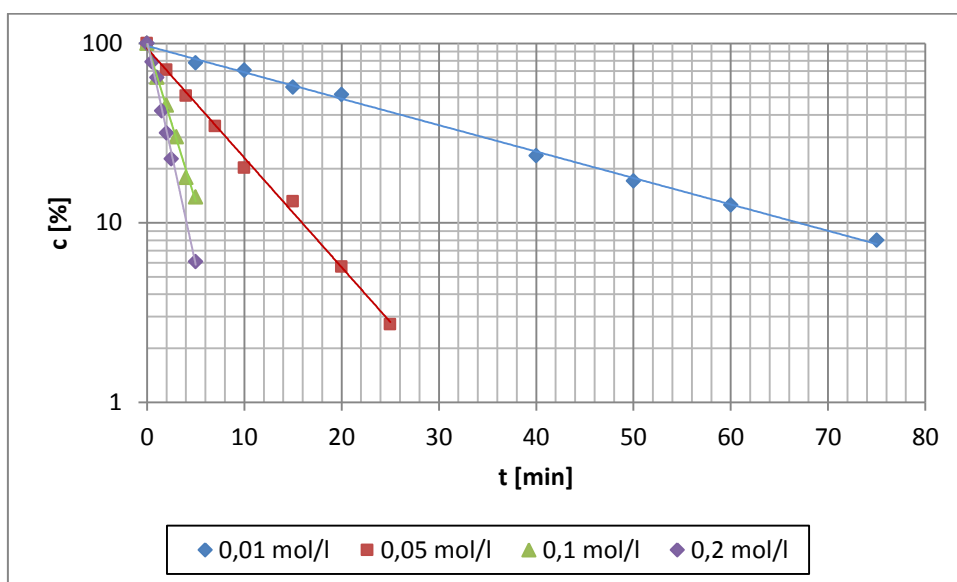
Stężenie [mol/l]	$a \pm \Delta a$ [h <sup>-1</sup> ]	$k \pm \Delta k$ [s <sup>-1</sup> ]	$S_a$	r	n
0,01	$-(1,91 \pm 0,06) \cdot 10^{-2}$	$(3,19 \pm 0,10) \cdot 10^{-4}$	$2,56 \cdot 10^{-4}$	-0,9995	8
0,05	$-(1,02 \pm 0,06) \cdot 10^{-1}$	$(1,71 \pm 0,09) \cdot 10^{-3}$	$2,35 \cdot 10^{-3}$	-0,9987	7
0,1	$-(2,09 \pm 0,26) \cdot 10^{-1}$	$(3,48 \pm 0,43) \cdot 10^{-3}$	$1,08 \cdot 10^{-2}$	-0,9934	7
0,2	$-(3,72 \pm 0,23) \cdot 10^{-1}$	$(6,20 \pm 0,39) \cdot 10^{-3}$	$9,73 \cdot 10^{-3}$	-0,9983	7



Rycina 13. Półlogarymiczne wykresy  $c$  [%] =  $f(t)$  reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w roztworach wodorotlenku sodu o stężeniu 0,05 – 0,50 mol/l, w temperaturze 288 K.

Tabela 15. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w roztworach wodorotlenku sodu o stężeniu 0,01 - 0,2 mol/l, w temperaturze 293 K ( $\mu = 0,50$  mol/l)

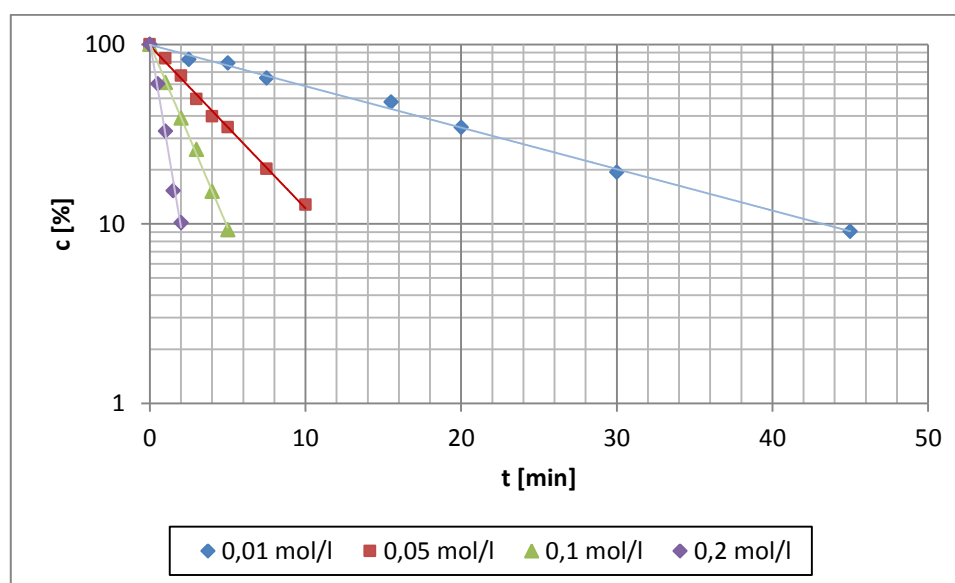
Stężenie [mol/l]	$a \pm \Delta a$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	$k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$S_a$	r	n
0,01	$-(3,38 \pm 0,14) \cdot 10^{-2}$	$(5,64 \pm 0,24) \cdot 10^{-4}$	$5,95 \cdot 10^{-4}$	-0,9989	9
0,05	$-(1,40 \pm 0,09) \cdot 10^{-1}$	$(2,34 \pm 0,14) \cdot 10^{-3}$	$3,64 \cdot 10^{-3}$	-0,9980	8
0,1	$-(4,03 \pm 0,35) \cdot 10^{-1}$	$(6,71 \pm 0,58) \cdot 10^{-3}$	$1,44 \cdot 10^{-2}$	-0,9975	6
0,2	$-(5,73 \pm 0,40) \cdot 10^{-1}$	$(9,55 \pm 0,67) \cdot 10^{-3}$	$1,65 \cdot 10^{-2}$	-0,9979	7



Rycina 14. Półlogarytmiczne wykresy  $c$  [%] =  $f(t)$  reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w roztworach wodorotlenku sodu o stężeniu 0,05 – 0,5 mol/l, w temperaturze 293 K.

Tabela 16. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu cefiofuru sodowego w roztworach wodorotlenku o stężeniu 0,01 - 0,2 mol/l, w temperaturze 298 K ( $\mu = 0,50$  mol/l)

Stężenie [mol/l]	$a \pm \Delta a$ [h <sup>-1</sup> ]	$k \pm \Delta k$ [s <sup>-1</sup> ]	$S_a$	r	n
0,01	$-(5,32 \pm 0,29) \cdot 10^{-2}$	$(8,86 \pm 0,48) \cdot 10^{-4}$	$1,18 \cdot 10^{-3}$	-0,9985	8
0,05	$-(2,08 \pm 0,13) \cdot 10^{-1}$	$(3,47 \pm 0,22) \cdot 10^{-3}$	$5,46 \cdot 10^{-3}$	-0,9980	8
0,1	$-(4,71 \pm 0,21) \cdot 10^{-1}$	$(7,84 \pm 0,34) \cdot 10^{-3}$	$8,38 \cdot 10^{-3}$	-0,9994	6
0,2	$-(1,19 \pm 0,14) \cdot 10^{-1}$	$(1,98 \pm 0,24) \cdot 10^{-2}$	$5,89 \cdot 10^{-2}$	-0,9963	5



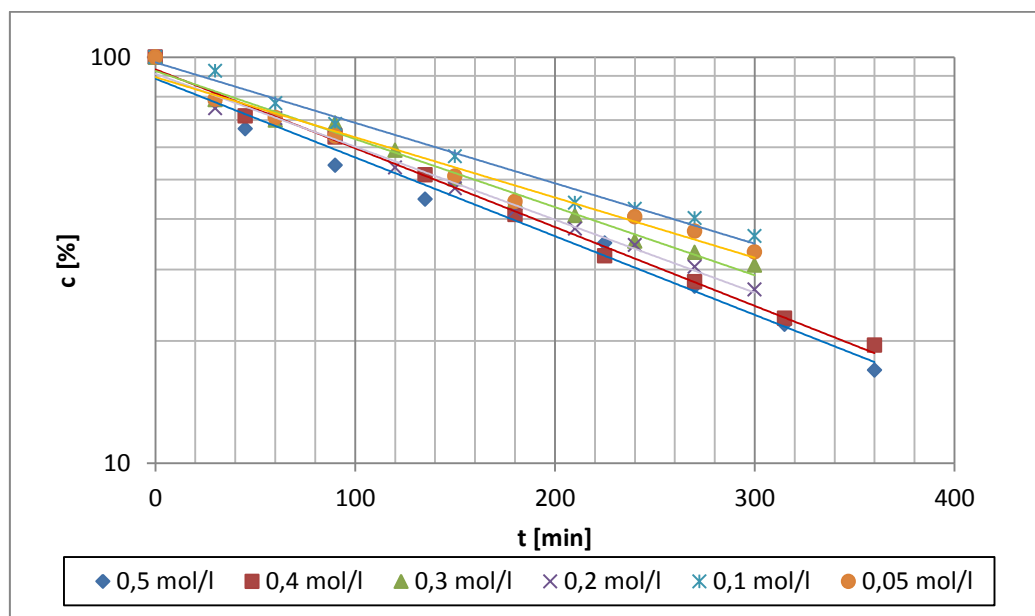
Rycina 15. Półlogarytmiczne wykresy  $c$  [%] =  $f$  ( $t$ ) reakcji rozkładu cefiofuru sodowego w roztworach wodorotlenku sodu, o stężeniu 0,05 – 0,50 mol/l, w temperaturze 298 K.



*Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu siarczianu cefkwinu w kwasie solnym i roztworach wodorotlenku sodu*

Tabela 17. Parametry kinetyczne rozkładu siarczianu cefkwinu w roztworach kwasu solnego o stężeniu 0,05 – 0,50 mol/l, w temperaturze 343 K ( $\mu = 0,50$  mol/l)

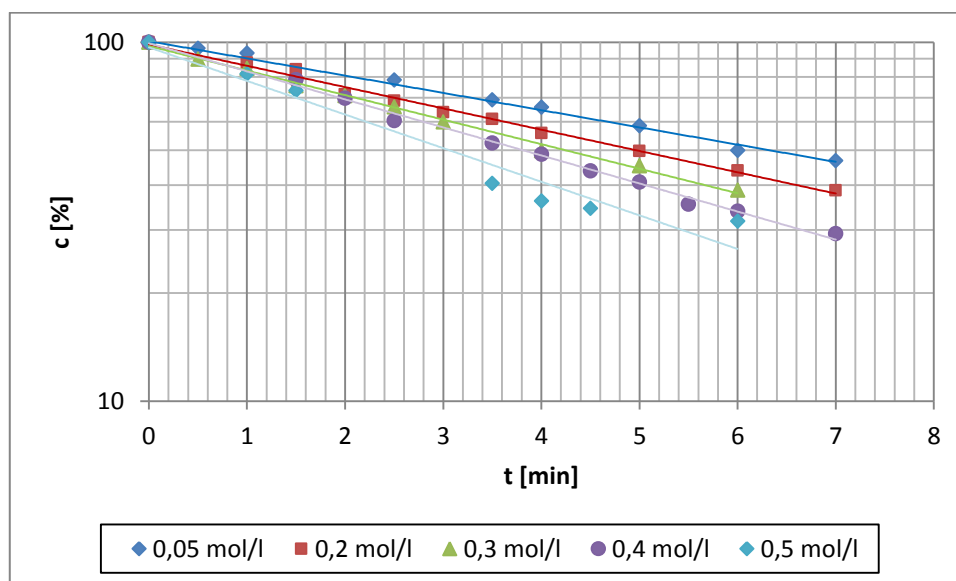
Stężenie [mol/l]	$a \pm \Delta a$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$S_a$	r	n
0,05	$-(3,38 \pm 0,44) \cdot 10^{-3}$	$(5,63 \pm 0,73) \cdot 10^{-5}$	$1,80 \cdot 10^{-4}$	-0,9875	9
0,1	$-(3,41 \pm 0,32) \cdot 10^{-3}$	$(5,68 \pm 0,53) \cdot 10^{-5}$	$1,40 \cdot 10^{-4}$	-0,9955	9
0,2	$-(4,14 \pm 0,33) \cdot 10^{-3}$	$(6,90 \pm 0,55) \cdot 10^{-5}$	$1,46 \cdot 10^{-4}$	-0,9945	11
0,3	$-(3,82 \pm 0,38) \cdot 10^{-3}$	$(6,44 \pm 0,63) \cdot 10^{-5}$	$1,53 \cdot 10^{-4}$	-0,9930	11
0,4	$-(4,47 \pm 0,32) \cdot 10^{-3}$	$(7,45 \pm 0,53) \cdot 10^{-5}$	$1,30 \cdot 10^{-4}$	-0,9971	9
0,5	$-(4,46 \pm 0,58) \cdot 10^{-3}$	$(7,44 \pm 0,97) \cdot 10^{-5}$	$2,39 \cdot 10^{-4}$	-0,9901	9



Rycina 16. Półlogarytmiczne wykresy  $c$  [%] =  $f$  ( $t$ ) reakcji rozkładu siarczianu cefkwinu w roztworach kwasu solnego o stężeniu 0,05 – 0,5 mol/l w temperaturze 343 K.

Tabela 18. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomowego w roztworach wodorotlenku sodu o stężeniu 0,05 - 0,50 mol/l, w temperaturze 298 K ( $\mu = 0,50$  mol/l)

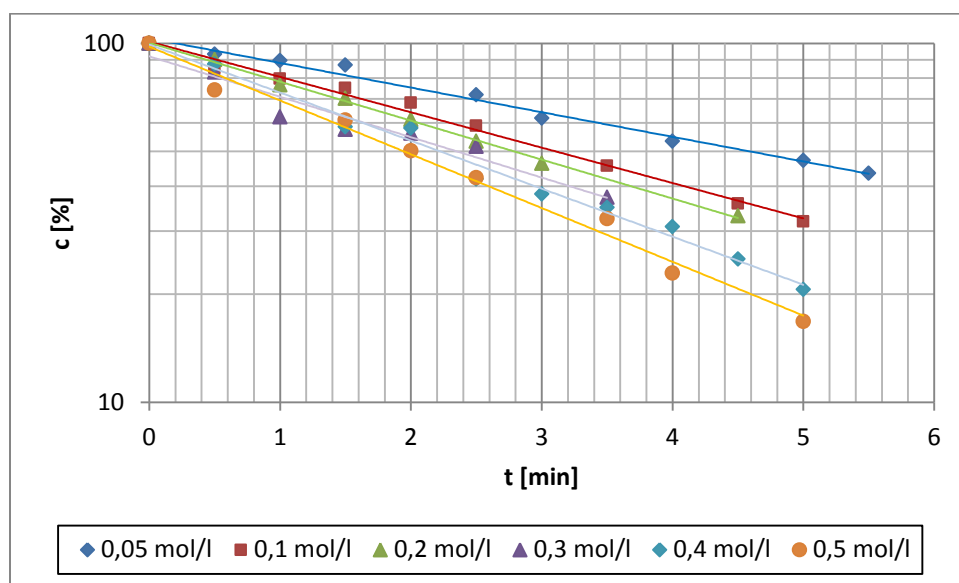
Stężenie [mol/l]	$a \pm \Delta a$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$k$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$S_a$	$r$	$n$
0,05	$-(1,11 \pm 0,11) \cdot 10^{-1}$	$(1,84 \pm 0,19) \cdot 10^{-3}$	$49,64 \cdot 10^{-4}$	-0,9920	10
0,2	$-(1,37 \pm 0,09) \cdot 10^{-1}$	$(2,28 \pm 0,15) \cdot 10^{-3}$	$40,76 \cdot 10^{-4}$	-0,9960	11
0,3	$-(1,57 \pm 0,09) \cdot 10^{-1}$	$(2,62 \pm 0,14) \cdot 10^{-3}$	$37,56 \cdot 10^{-4}$	-0,9977	10
0,4	$-(1,80 \pm 0,10) \cdot 10^{-1}$	$(3,00 \pm 0,16) \cdot 10^{-3}$	$42,82 \cdot 10^{-4}$	-0,9975	11
0,5	$-(2,20 \pm 0,37) \cdot 10^{-1}$	$(3,67 \pm 0,62) \cdot 10^{-3}$	$153,09 \cdot 10^{-4}$	-0,9858	8



Rycina 17. Półlogarymiczne wykresy  $c[\%] = f(t)$  reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomowego w roztworach wodorotlenku sodu o stężeniu 0,05 - 0,50 mol/l, w temperaturze 298 K.

Tabela 19. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu siarczanu cefkwinu w roztworach wodorotlenku sodu o stężeniu 0,05 - 0,5 mol/l w temperaturze 303 K ( $\mu = 0,50$  mol/l)

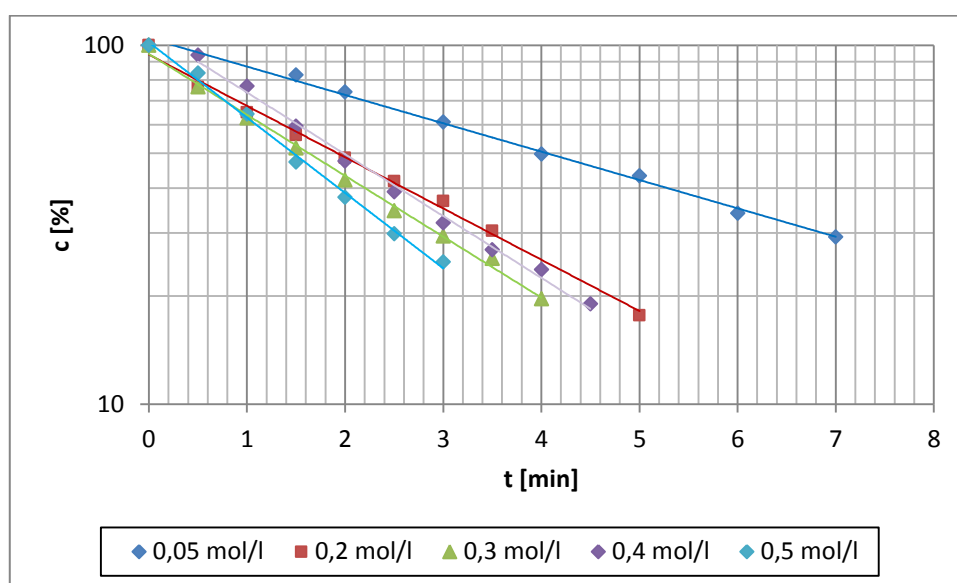
Stężenie [mol/l]	$a \pm \Delta a$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$k$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$S_a$	$r$	$n$
0,05	$-(1,58 \pm 0,15) \cdot 10^{-1}$	$(2,65 \pm 0,26) \cdot 10^{-3}$	$65,52 \cdot 10^{-4}$	-0,9940	9
0,1	$-(2,27 \pm 0,18) \cdot 10^{-1}$	$(3,78 \pm 0,31) \cdot 10^{-3}$	$78,06 \cdot 10^{-4}$	-0,9959	9
0,2	$-(2,50 \pm 0,11) \cdot 10^{-1}$	$(4,16 \pm 0,19) \cdot 10^{-3}$	$45,74 \cdot 10^{-4}$	-0,9990	8
0,3	$-(2,59 \pm 0,68) \cdot 10^{-1}$	$(4,32 \pm 1,14) \cdot 10^{-3}$	$288,97 \cdot 10^{-4}$	-0,9703	7
0,4	$-(3,08 \pm 0,27) \cdot 10^{-1}$	$(5,13 \pm 0,45) \cdot 10^{-3}$	$117,09 \cdot 10^{-4}$	-0,9943	11
0,5	$-(3,45 \pm 0,37) \cdot 10^{-1}$	$(5,75 \pm 0,62) \cdot 10^{-3}$	$160,84 \cdot 10^{-4}$	-0,9935	8



Rycina 18. Półlogarytmiczne wykresy  $c$  [%] =  $f(t)$  reakcji rozkładu siarczanu cefkwinu w roztworach wodorotlenku sodu o stężeniu 0,05 - 0,5 mol/l, w temperaturze 303 K.

Tabela 20. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu siarczianu cefkwinu w roztworach wodorotlenku sodu o stężeniu 0,05 - 0,5 mol/l, w temperaturze 308 K ( $\mu = 0,50$  mol/l)

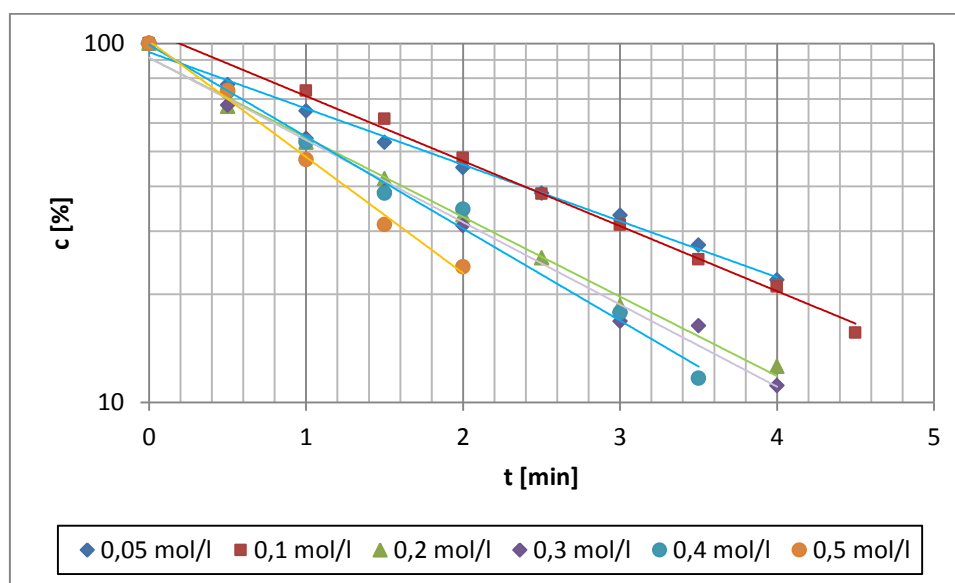
Stężenie [mol/l]	$a \pm \Delta a$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$k$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$S_a$	$r$	$n$
0,05	$-(1,82 \pm 0,12) \cdot 10^{-1}$	$(3,03 \pm 0,20) \cdot 10^{-3}$	$49,36 \cdot 10^{-4}$	-0,9978	8
0,2	$-(3,29 \pm 0,22) \cdot 10^{-1}$	$(5,48 \pm 0,36) \cdot 10^{-3}$	$90,97 \cdot 10^{-4}$	-0,9973	9
0,3	$-(3,91 \pm 0,22) \cdot 10^{-1}$	$(6,51 \pm 0,36) \cdot 10^{-3}$	$92,25 \cdot 10^{-4}$	-0,9981	9
0,4	$-(3,96 \pm 0,27) \cdot 10^{-1}$	$(6,61 \pm 0,45) \cdot 10^{-3}$	$113,46 \cdot 10^{-4}$	-0,9971	9
0,5	$-(4,83 \pm 0,38) \cdot 10^{-1}$	$(8,05 \pm 0,63) \cdot 10^{-3}$	$146,13 \cdot 10^{-4}$	-0,9977	7



Rycina 19. Półlogarymiczne wykresy  $c[\%] = f(t)$  reakcji rozkładu siarczianu cefkwinu w roztworach wodorotlenku sodu o stężeniu 0,05 - 0,5 mol/l, w temperaturze 308 K.

Tabela 21. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomu w roztworach wodorotlenku sodu o stężeniu 0,05 - 0,5 mol/l, w temperaturze 313 K ( $\mu = 0,50$  mol/l)

Stężenie [mol/l]	$a \pm \Delta a$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$k$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$S_a$	$r$	$n$
0,05	$-(3,61 \pm 0,21) \cdot 10^{-1}$	$(6,01 \pm 0,35) \cdot 10^{-3}$	$87,89 \cdot 10^{-4}$	-0,9979	9
0,1	$-(4,17 \pm 0,27) \cdot 10^{-1}$	$(6,95 \pm 0,46) \cdot 10^{-3}$	$108,32 \cdot 10^{-4}$	-0,9973	9
0,2	$-(5,10 \pm 0,41) \cdot 10^{-1}$	$(8,51 \pm 0,68) \cdot 10^{-3}$	$1266,24 \cdot 10^{-4}$	-0,9968	8
0,3	$-(5,28 \pm 0,54) \cdot 10^{-1}$	$(8,80 \pm 0,90) \cdot 10^{-3}$	$219,88 \cdot 10^{-4}$	-0,9948	8
0,4	$-(5,90 \pm 0,63) \cdot 10^{-1}$	$(9,83 \pm 1,29) \cdot 10^{-3}$	$243,57 \cdot 10^{-4}$	-0,9958	7
0,5	$-(7,45 \pm 1,09) \cdot 10^{-1}$	$(12,41 \pm 1,82) \cdot 10^{-3}$	$342,55 \cdot 10^{-4}$	-0,9968	5

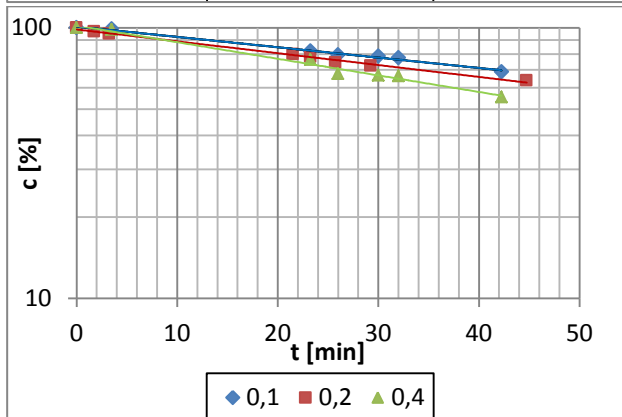
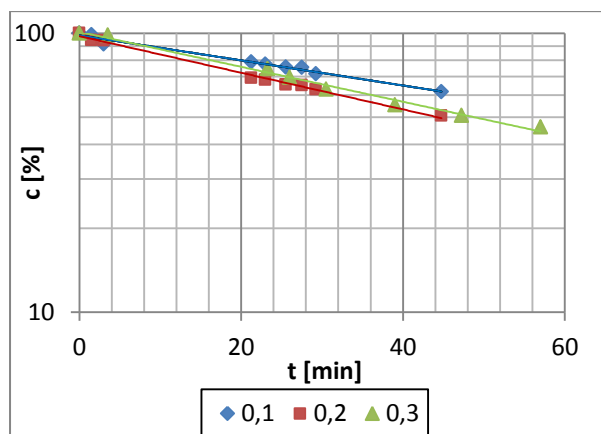
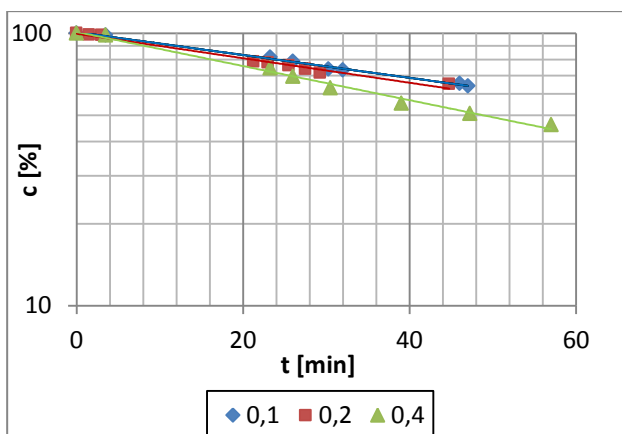


Rycina 20. Półlogarytmiczne wykresy  $c[\%] = f(t)$  reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomu w roztworach wodorotlenku sodu o stężeniu 0,05 - 0,5 mol/l, w temperaturze 313 K.

*Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w buforze fosforanowym (pH 1,54 – 2,95)*

Tabela 22. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w buforze fosforanowym w temperaturze 323 K ( $\mu = 0,50$  mol/l)

Stężenie składników buforu			Parametry kinetyczne				
			$a \pm \Delta a$ [h <sup>-1</sup> ]	$k \pm \Delta k$ [s <sup>-1</sup> ]	$S_a$	$r$	$n$
[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ]	[KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	B <sub>T</sub> ; mol/l					
pH 1,54							
0,227	0,1730	0,400	$-(1,44 \pm 0,15) 10^{-2}$	$(4,01 \pm 0,41) 10^{-6}$	$6,02 10^{-4}$	-0,9948	8
0,114	0,0860	0,200	$-(1,04 \pm 0,12) 10^{-2}$	$(2,88 \pm 0,34) 10^{-6}$	$5,09 10^{-4}$	-0,9916	9
0,05685	0,04315	0,100	$-(9,65 \pm 0,67) 10^{-3}$	$(2,68 \pm 0,19) \cdot 10^{-6}$	$2,74 10^{-4}$	-0,9976	8
pH 2,53							
0,0882	0,2118	0,300	$-(1,77 \pm 0,20) 10^{-2}$	$(4,91 \pm 0,55) 10^{-6}$	$7,68 10^{-4}$	-0,9953	7
0,0588	0,1412	0,200	$-(1,51 \pm 0,10) 10^{-2}$	$(4,20 \pm 0,28) 10^{-6}$	$4,27 10^{-4}$	-0,9972	9
0,0294	0,0706	0,100	$-(1,04 \pm 0,12) 10^{-2}$	$(2,88 \pm 0,32) 10^{-6}$	$4,85 10^{-4}$	-0,9924	9
pH 3,20							
0,0466	0,3534	0,400	$-(1,41 \pm 1,21) 10^{-2}$	$(3,92 \pm 0,57) 10^{-6}$	$8,02 10^{-4}$	-0,9920	7
0,0233	0,1767	0,200	$-(1,01 \pm 0,09) 10^{-2}$	$(2,81 \pm 0,24) 10^{-6}$	$3,53 10^{-4}$	-0,9964	8
0,0116	0,0884	0,100	$-(8,80 \pm 0,97) 10^{-3}$	$(2,45 \pm 0,27) \cdot 10^{-6}$	$3,77 10^{-4}$	-0,9954	7

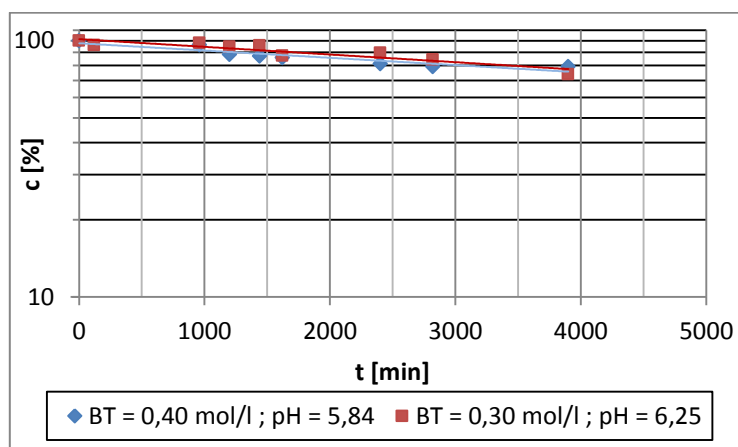


Rycina 21. Półlogarytmiczne wykresy  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w buforze fosforanowym o pH 1,54 (A), 2,53 (B) i 2,95 (C), w temperaturze 323 K.

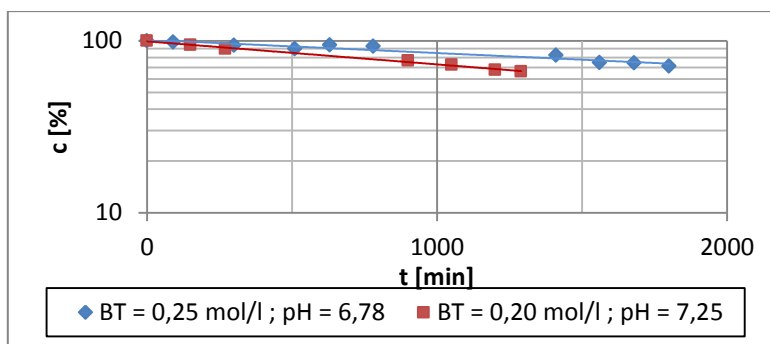
*Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w buforze fosforanowym (pH 5,84 – 7,25)*

Tabela 23. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w buforze fosforanowym w temperaturze 323 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

Stężenie [mol/l]	pH	$a \pm \Delta a [\text{h}^{-1}]$	$k \pm \Delta k [\text{s}^{-1}]$	$S_a$	r	n
0,4	5,84	$-(0,65 \pm 0,27) \cdot 10^{-4}$	$(1,09 \pm 0,46) \cdot 10^{-6}$	$1,13 \cdot 10^{-5}$	-0,9216	8
0,3	6,25	$-(0,68 \pm 0,27) \cdot 10^{-4}$	$(1,15 \pm 0,45) \cdot 10^{-6}$	$1,10 \cdot 10^{-5}$	-0,9216	9
0,25	6,78	$-(1,78 \pm 0,43) \cdot 10^{-3}$	$(2,96 \pm 0,71) \cdot 10^{-6}$	$1,75 \cdot 10^{-5}$	-0,9634	10
0,15		$-(1,62 \pm 0,37) \cdot 10^{-4}$	$(2,70 \pm 0,61) \cdot 10^{-6}$	$1,51 \cdot 10^{-5}$	-0,9707	9
0,2	7,25	$-(3,08 \pm 0,25) \cdot 10^{-4}$	$(5,13 \pm 0,42) \cdot 10^{-6}$	$1,02 \cdot 10^{-5}$	-0,9973	7
0,10		$-(2,65 \pm 0,48) \cdot 10^{-4}$	$(4,41 \pm 0,80) \cdot 10^{-6}$	$1,97 \cdot 10^{-5}$	-0,9891	6



Rycina 22. Półlogarymiczny wykres zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w buforze fosforanowym, w temperaturze 323 K.



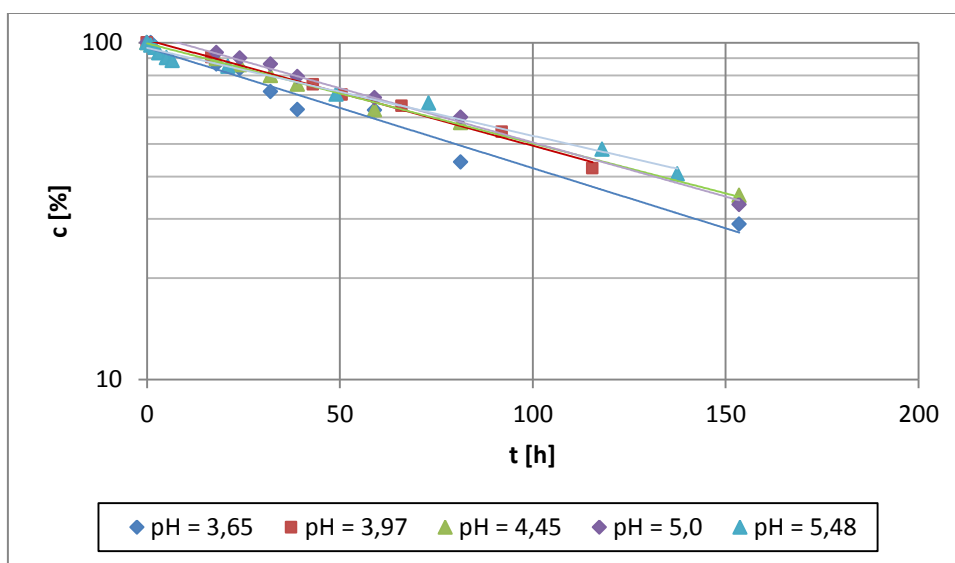
Rycina 23. Półlogarymiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w buforze fosforanowym, w temperaturze 323 K.



Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w buforze octanowym (pH 3,65 – 5,48)

Tabela 24. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w buforze octanowym w temperaturze 323 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

$B_T$ [mol/l]	pH	$a \pm \Delta a$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	$k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$S_a$	r	n
0,40	3,65	$-(8,20 \pm 1,49) \cdot 10^{-3}$	$(2,28 \pm 0,41) \cdot 10^{-6}$	$6,10 \cdot 10^{-4}$	-0,9838	8
	4,45	$-(6,83 \pm 0,48) \cdot 10^{-3}$	$(1,90 \pm 0,13) \cdot 10^{-6}$	$1,98 \cdot 10^{-4}$	-0,9975	8
	5,00	$-(7,41 \pm 0,64) \cdot 10^{-3}$	$(2,06 \pm 0,18) \cdot 10^{-6}$	$2,59 \cdot 10^{-4}$	-0,9963	8
	3,97	$-(7,24 \pm 0,76) \cdot 10^{-3}$	$(2,01 \pm 0,21) \cdot 10^{-6}$	$2,94 \cdot 10^{-4}$	-0,9959	7
	5,48	$-(6,00 \pm 0,51) \cdot 10^{-3}$	$(1,67 \pm 0,14) \cdot 10^{-6}$	$2,26 \cdot 10^{-4}$	-0,9937	11
0,10	3,97	$-(8,84 \pm 1,87) \cdot 10^{-3}$	$(2,46 \pm 0,52) \cdot 10^{-6}$	$7,92 \cdot 10^{-4}$	-0,9731	9
	5,48	$-(4,70 \pm 0,71) \cdot 10^{-3}$	$(1,30 \pm 0,20) \cdot 10^{-6}$	$2,75 \cdot 10^{-4}$	-0,9915	7

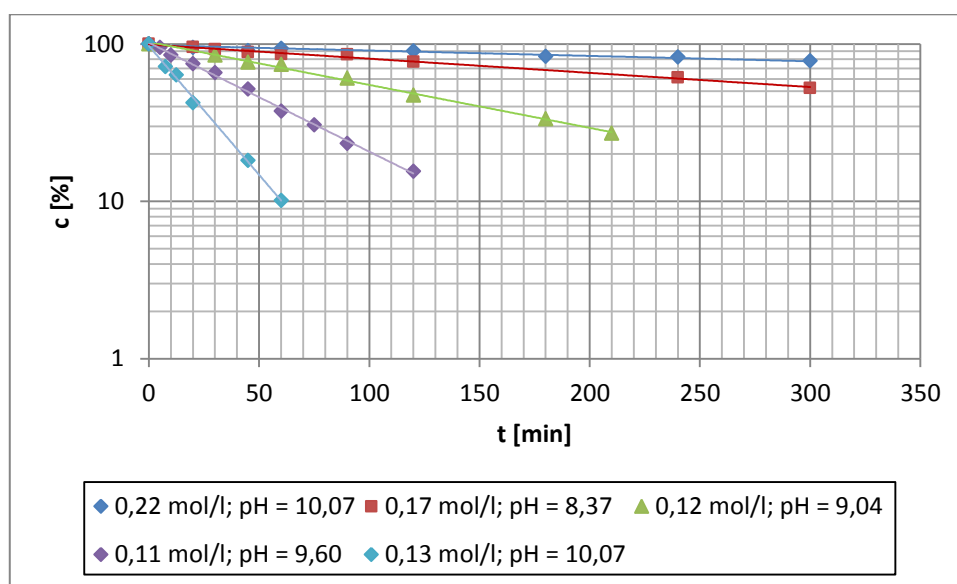


Rycina 24. Półlogarytmiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w buforze octanowym, w temperaturze 323 K.

*Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w buforze boranowym (pH 7,49 – 10,07)*

Tabela 25. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w buforze boranowym w temperaturze 323 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

Stężenie [mol/l]	pH	$a \pm \Delta a [\text{h}^{-1}]$	$k \pm \Delta k [\text{s}^{-1}]$	$S_a$	r	n
0,22	7,49	$-(0,78 \pm 0,21) \cdot 10^{-3}$	$(1,31 \pm 0,35) \cdot 10^{-5}$	$8,67 \cdot 10^{-5}$	-0,9599	9
0,11		$-(0,94 \pm 0,26) \cdot 10^{-3}$	$(1,56 \pm 0,43) \cdot 10^{-5}$	$1,05 \cdot 10^{-4}$	-0,9700	7
0,17	8,37	$-(2,07 \pm 0,17) \cdot 10^{-3}$	$(3,45 \pm 0,28) \cdot 10^{-5}$	$6,83 \cdot 10^{-5}$	-0,9962	9
0,12	9,04	$-(6,28 \pm 0,37) \cdot 10^{-3}$	$(10,46 \pm 0,61) \cdot 10^{-5}$	$1,50 \cdot 10^{-4}$	-0,9983	8
0,11	9,60	$-(15,94 \pm 0,67) \cdot 10^{-3}$	$(26,56 \pm 1,11) \cdot 10^{-5}$	$2,73 \cdot 10^{-4}$	-0,9988	10
0,13	10,07	$-(37,71 \pm 2,29) \cdot 10^{-3}$	$(62,86 \pm 3,82) \cdot 10^{-5}$	$9,38 \cdot 10^{-4}$	-0,9988	6
0,06		$-(34,74 \pm 1,93) \cdot 10^{-3}$	$(57,90 \pm 3,21) \cdot 10^{-5}$	$7,87 \cdot 10^{-4}$	-0,9985	8

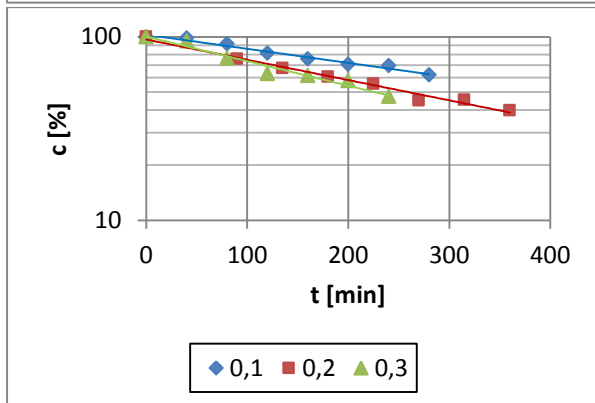
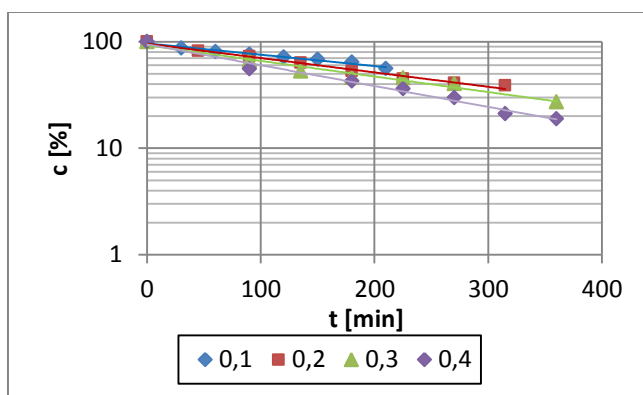
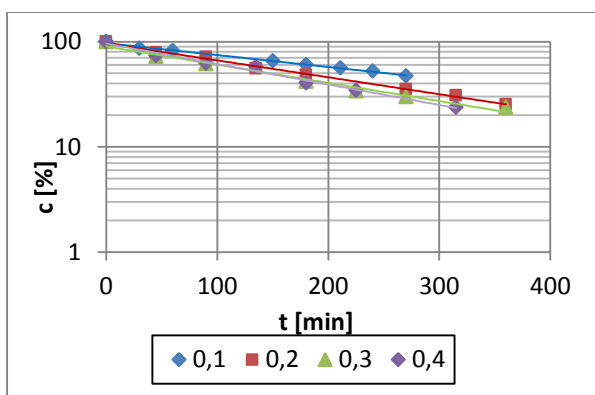


Rycina 25. Półlogarymiczne wykresy zależności  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w buforze boranowym, w temperaturze 323 K.

*Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomu w buforze fosforanowym (pH 1,54 – 2,95)*

Tabela 26. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w buforze fosforanowym, w temperaturze 343 K,  $\mu = 0,50$  mol/l

Stężenie składników buforu			Parametry kinetyczne				
			$a \pm \Delta a$ [min <sup>-1</sup> ]	$k \pm \Delta k$ [s <sup>-1</sup> ]	$S_a$	$r$	$n$
[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ]	[KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	B <sub>T</sub> ; mol/l					
pH 1,54							
0,227	0,173	0,400	$-(4,46 \pm 0,41) 10^{-3}$	$(7,44 \pm 0,68) 10^{-5}$	$1,72 10^{-4}$	-0,9948	7
0,171	0,129	0,300	$-(4,00 \pm 0,47) 10^{-3}$	$(6,66 \pm 0,79) 10^{-5}$	$2,0 10^{-4}$	-0,9914	7
0,114	0,086	0,200	$-(3,71 \pm 0,22) 10^{-3}$	$(6,18 \pm 0,37) 10^{-5}$	$8,96 10^{-5}$	-0,9980	8
0,05685	0,04315	0,100	$-(2,62 \pm 0,13) 10^{-3}$	$(4,36 \pm 0,22) \cdot 10^{-5}$	$5,79 10^{-5}$	-0,9978	8
pH 2,55							
0,1176	0,2824	0,400	$-(4,51 \pm 0,53) 10^{-3}$	$(7,52 \pm 0,88) 10^{-5}$	$2,23 10^{-4}$	-0,9916	7
0,0882	0,2118	0,300	$-(3,41 \pm 0,54) 10^{-3}$	$(5,68 \pm 0,90) 10^{-5}$	$2,29 10^{-4}$	-0,9845	7
0,0588	0,1412	0,200	$-(3,01 \pm 0,35) 10^{-3}$	$(5,01 \pm 0,58) 10^{-5}$	$1,48 10^{-4}$	-0,9916	8
0,0294	0,0706	0,100	$-(2,30 \pm 0,21) 10^{-3}$	$(3,83 \pm 0,35) \cdot 10^{-5}$	$9,3 10^{-5}$	-0,9927	11
pH 2,95							
0,0350	0,2650	0,300	$-(2,86 \pm 0,50) 10^{-3}$	$(4,76 \pm 0,84) 10^{-5}$	$2,13 10^{-4}$	-0,9811	8
0,0233	0,1767	0,200	$-(2,59 \pm 0,26) 10^{-3}$	$(4,31 \pm 0,43) 10^{-5}$	$1,09 10^{-4}$	-0,9938	8
0,0116	0,0884	0,100	$-(1,86 \pm 0,23) 10^{-3}$	$(3,09 \pm 0,39) \cdot 10^{-5}$	$9,82 10^{-5}$	-0,9903	9



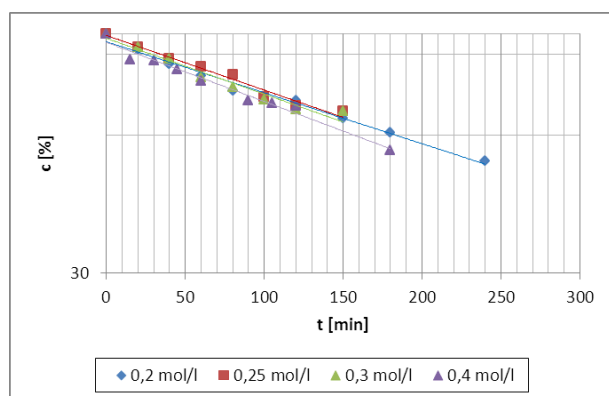
Rycina 26.

Półlogarytmiczne wykresy  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomu w buforze fosforanowym o pH 1,54 (A), 2,53 (B) i 2,95 (C), w temperaturze 343 K.

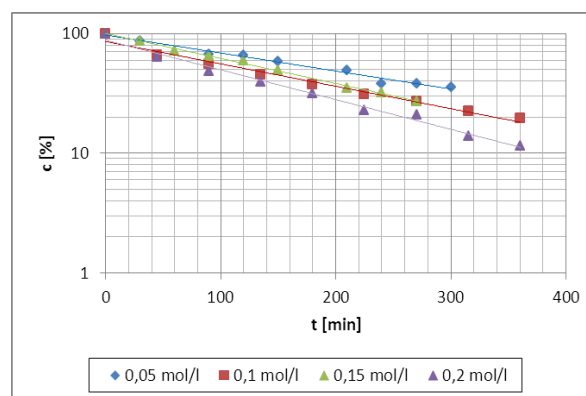
Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomu w buforze fosforanowym (pH 5,76 – 6,82)

Tabela 27. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomu w buforze fosforanowym, w temperaturze 343 K ( $\mu = 0,50$  mol/l)

Warunki reakcji			Parametry kinetyczne				
			$a \pm \Delta a$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	$k \pm \Delta k$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$S_a$	$r$	$n$
[ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ]	[ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ]	$B_T$ ; mol/l					
pH 5,76							
0,3400	0,0600	0,4000	$-(3,00 \pm 0,321) 10^{-3}$	$(5,00 \pm 0,53) 10^{-5}$	$1,40 10^{-4}$	-0,9903	9
0,2550	0,0450	0,3000	$-(2,81 \pm 0,57) 10^{-3}$	$(4,68 \pm 0,95) 10^{-5}$	$2,33 10^{-4}$	-0,9799	8
0,2125	0,0375	0,2500	$-(2,75 \pm 0,40) 10^{-3}$	$(4,58 \pm 0,72) 10^{-5}$	$1,78 10^{-4}$	-0,9877	8
0,1700	0,0300	0,3000	$-(2,56 \pm 0,25) 10^{-3}$	$(4,27 \pm 0,42) 10^{-5}$	$1,01 10^{-4}$	-0,9928	10
pH 6,82							
0,08	0,1200	0,20	$-(5,72 \pm 0,56) 10^{-3}$	$(9,53 \pm 0,93) 10^{-5}$	$2,36 10^{-4}$	-0,9941	9
0,06	0,0900	0,15	$-(4,80 \pm 0,28) 10^{-3}$	$(8,00 \pm 0,47) 10^{-5}$	$1,24 10^{-4}$	-0,9973	9
0,04	0,0600	0,10	$-(4,31 \pm 0,53) 10^{-3}$	$(7,18 \pm 0,88) 10^{-5}$	$2,22 10^{-4}$	-0,9908	9
0,02	0,0300	0,05	$-(3,45 \pm 0,32) 10^{-3}$	$(5,74 \pm 0,53) \cdot 10^{-5}$	$1,41 10^{-4}$	-0,9925	9



A



B

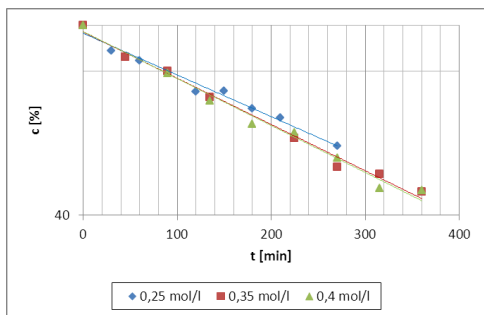
Rycina 27.

Półlogarytmiczne wykresy  $c$  [%] =  $f(t)$  reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomu w buforze fosforanowym o pH 5,76 (A) i 6,82 (B), w temperaturze 343 K.

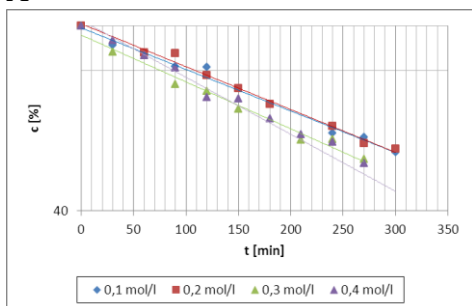
*Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomu w buforze octanowym (pH 3,66 – 5,47)*

Tabela 28. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomu w buforze octanowym, w temperaturze 343 K ( $\mu = 0,50 \text{ mol/l}$ )

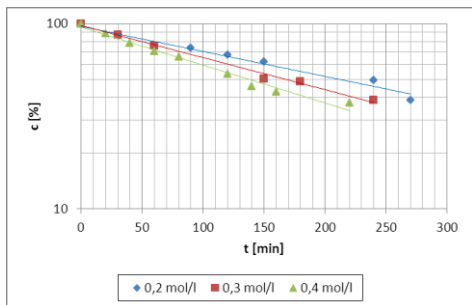
Warunki reakcji			Parametry kinetyczne				
			$a \pm \Delta a \text{ [h}^{-1}\text{]}$	$k \pm \Delta k \text{ [s}^{-1}\text{]}$	$S_a$	$r$	$n$
[CH <sub>3</sub> COOH]	[CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ]	B <sub>T</sub> ; mol/l					
pH 3,66							
0,360	0,040	0,40	$-(2,31 \pm 0,21) 10^{-3}$	$(3,84 \pm 0,38) 10^{-6}$	$9,59 10^{-5}$	-0,9940	8
0,315	0,035	0,35	$-(2,23 \pm 0,20) 10^{-3}$	$(3,71 \pm 0,33) 10^{-5}$	$8,28 10^{-5}$	-0,9952	8
0,225	0,025	0,25	$-(1,99 \pm 0,18) 10^{-3}$	$(3,31 \pm 0,30) 10^{-5}$	$7,86 10^{-5}$	-0,9930	8
pH 3,97							
0,32	0,08	0,40	$-(3,87 \pm 0,57) 10^{-3}$	$(6,46 \pm 0,96) 10^{-5}$	$2,34 10^{-4}$	-0,9839	8
0,24	0,06	0,30	$-(3,12 \pm 0,53) 10^{-3}$	$(5,03 \pm 0,88) 10^{-5}$	$2,16 10^{-4}$	-0,9874	7
0,08	0,02	0,10	$-(1,98 \pm 0,34) 10^{-3}$	$(3,40 \pm 0,52) 10^{-5}$	$1,43 10^{-4}$	-0,9823	7
pH 4,45							
0,24	0,16	0,40	$-(2,82 \pm 0,48) 10^{-3}$	$(4,70 \pm 0,81) 10^{-5}$	$1,98 10^{-4}$	-0,9785	11
0,18	0,12	0,30	$-(2,29 \pm 0,21) 10^{-3}$	$(3,82 \pm 0,35) 10^{-5}$	$9,19 10^{-5}$	-0,9928	8
0,12	0,08	0,20	$-(2,11 \pm 0,15) 10^{-3}$	$(3,55 \pm 0,24) 10^{-5}$	$6,29 10^{-5}$	-0,9965	9
0,06	0,04	0,10	$-(2,07 \pm 0,22) 10^{-3}$	$(3,44 \pm 0,37) \cdot 10^{-5}$	$9,59 10^{-5}$	-0,9915	9
pH 5,01							
0,12	0,28	0,40	$-(2,40 \pm 0,20) 10^{-3}$	$(4,00 \pm 0,33) 10^{-5}$	$8,52 10^{-5}$	-0,9950	10
0,09	0,21	0,30	$-(2,00 \pm 0,19) 10^{-3}$	$(3,33 \pm 0,31) 10^{-5}$	$8,17 10^{-5}$	-0,9934	10
0,06	0,14	0,20	$-(1,96 \pm 0,20) 10^{-3}$	$(3,27 \pm 0,33) 10^{-5}$	$8,72 10^{-5}$	-0,9913	8
pH 5,47							
0,04	0,36	0,40	$-(4,52 \pm 0,56) 10^{-3}$	$(7,53 \pm 0,93) 10^{-5}$	$2,28 10^{-4}$	-0,9887	9
0,03	0,27	0,30	$-(3,95 \pm 0,38) 10^{-3}$	$(6,58 \pm 0,64) 10^{-5}$	$1,63 10^{-4}$	-0,9941	6
0,02	0,18	0,20	$-(3,18 \pm 0,39) 10^{-3}$	$(5,29 \pm 0,65) 10^{-5}$	$1,65 10^{-4}$	-0,9906	8



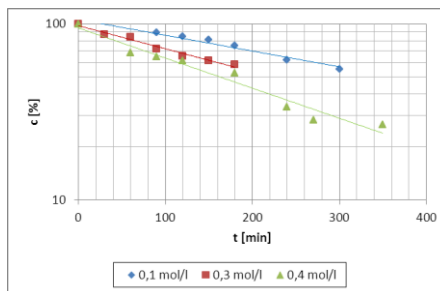
A



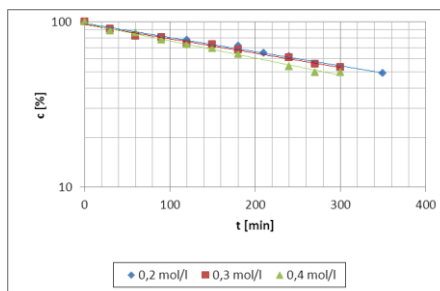
B



C



D



E

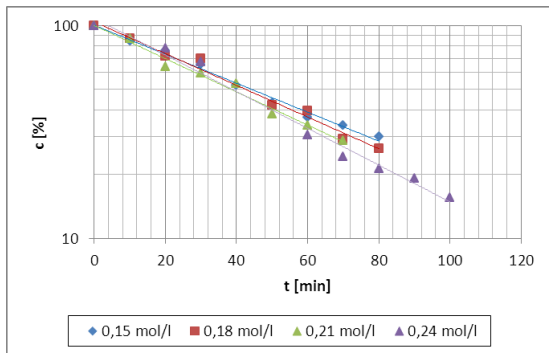
Rycina 28.  
Półlogarymiczne wykresy  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomu w buforze octanowym o pH 3,66 (A), 3,97 (B), 4,45 (C) 5,01 (D) 5,47 (E), w temperaturze 343 K.

*Obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomu w buforze boranowym (pH 7,52 – 10,48)*

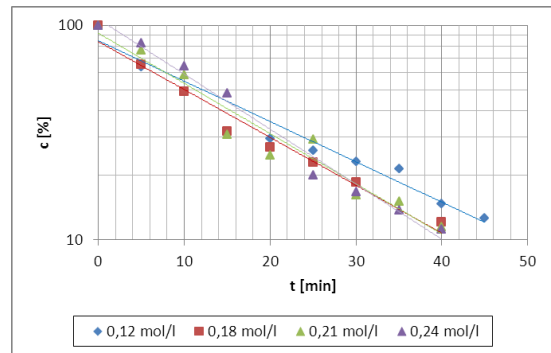
Tabela 29. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomu w buforze boranowym, w temperaturze 343 K ( $\mu = 0,50$  mol/l)

Warunki reakcji			Parametry kinetyczne				
			$a \pm \Delta a$ [h <sup>-1</sup> ]	$k \pm \Delta k$ [s <sup>-1</sup> ]	$S_a$	$r$	$n$
[H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ]	[NaOH]	B <sub>T</sub> , mol/l					
pH 7,52							
0,221	0,019	0,240	$-(1,99 \pm 0,23) 10^{-2}$	$(3,31 \pm 0,39) 10^{-4}$	$9,47 10^{-4}$	-0,9932	8
0,193	0,017	0,210	$-(1,71 \pm 0,22) 10^{-2}$	$(2,99 \pm 0,36) 10^{-4}$	$8,92 10^{-4}$	-0,9927	8
0,166	0,014	0,180	$-(1,41 \pm 0,21) 10^{-2}$	$(2,86 \pm 0,35) 10^{-4}$	$8,67 10^{-4}$	-0,9924	8
0,138	0,012	0,150	$-(1,57 \pm 0,14) 10^{-2}$	$(2,61 \pm 0,23) 10^{-4}$	$5,76 10^{-4}$	-0,9953	9
pH 8,51							
0,195	0,045	0,240	$-(5,91 \pm 0,73) 10^{-2}$	$(9,85 \pm 1,21) 10^{-4}$	$29,76 10^{-4}$	-0,9927	8
0,171	0,039	0,210	$-(5,39 \pm 1,12) 10^{-2}$	$(8,99 \pm 1,87) 10^{-4}$	$45,83 10^{-4}$	-0,9756	9
0,147	0,033	0,180	$-(5,14 \pm 0,87) 10^{-2}$	$(8,57 \pm 1,45) 10^{-4}$	$35,57 10^{-4}$	-0,9859	8
0,098	0,022	0,120	$-(4,33 \pm 0,72) 10^{-2}$	$(7,22 \pm 1,20) 10^{-4}$	$29,54 10^{-4}$	-0,9863	8
pH 9,52							
0,162	0,078	0,240	$-(18,38 \pm 1,53) 10^{-2}$	$(30,63 \pm 2,55) 10^{-4}$	$62,43 10^{-4}$	-0,9960	9
0,121	0,059	0,180	$-(16,21 \pm 1,33) 10^{-2}$	$(27,01 \pm 2,21) 10^{-4}$	$54,22 10^{-4}$	-0,9961	9
0,101	0,049	0,150	$-(15,31 \pm 1,29) 10^{-2}$	$(25,52 \pm 2,14) 10^{-4}$	$52,53 10^{-4}$	-0,9965	8
0,081	0,039	0,120	$-(14,00 \pm 1,19) 10^{-2}$	$(23,34 \pm 1,99) 10^{-4}$	$48,76 10^{-4}$	-0,9964	8
pH 10,48							
0,126	0,114	0,240	$-(75,73 \pm 3,00) 10^{-2}$	$(126,21 \pm 4,99) 10^{-4}$	$122,41 10^{-4}$	-0,9992	8
0,110	0,100	0,210	$-(74,85 \pm 4,93) 10^{-2}$	$(125,76 \pm 8,22) 10^{-4}$	$201,51 10^{-4}$	-0,9978	8
0,095	0,085	0,180	$-(70,52 \pm 1,65) 10^{-2}$	$(117,53 \pm 2,75) 10^{-4}$	$67,40 10^{-4}$	-0,9997	8
0,079	0,071	0,150	$-(67,56 \pm 2,34) 10^{-2}$	$(112,60 \pm 3,90) 10^{-4}$	$95,52 10^{-4}$	-0,9994	8

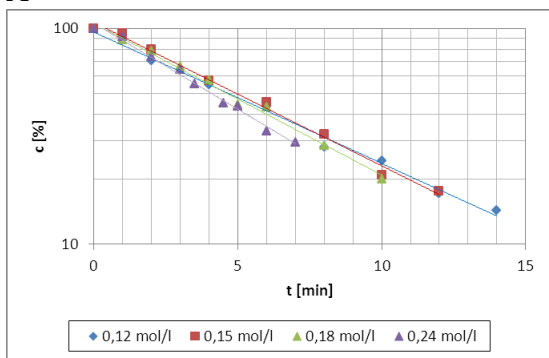




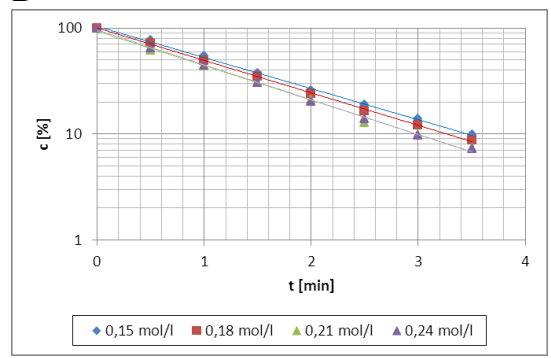
A



B



C



D

Rycina 29.

Półlogarytmiczne wykresy  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu siarczanu cefkwimomu w buforze boranowym o pH 7,52 (A), 8,51 (B), 9,51 (C) i 10,48 (D), w temperaturze 343 K.

#### 4.7. Ocena trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwionomu w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach do iniekcji

Trwałość ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwionomu w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach do iniekcji badano w następujących warunkach:

- temperatura pokojowa (295 K)
- temperatura ~279 K (2-8°C)
- temperatura 253 K po 0 h i po 30 dniach przechowywania.

##### *Wykonanie oznaczenia*

Odważono dokładnie 5,0 mg badanej substancji, rozpuszczono w 5,0 ml odpowiedniego rozpuszczalnika do iniekcji i umieszczono w sterylnych polietylenowych ampułkach o pojemności 5 ml. Tak przygotowane roztwory chroniono od światła. Po dokładnym wymieszaniu, w podanych w tabelach 30 – 33 odstępach czasu, pobierano 50 µl badanego roztworu i oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Zastosowano parametry rozdzielania opisane w rozdziale 4.4., jednakże dla potrzeb tego badania sprawdzono selektywność metod. Stwierdzono, że zastosowane parametry rozdzielania są odpowiednie do oceny trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwionomu w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach do iniekcji.

Ubytek stężenia substratu po czasie  $t$  (wyrażony w procentach) obliczono przyjmując stężenie po czasie  $t = 0$  jako 100%. Wyniki badania trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwionomu w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach do iniekcji przedstawiono w tabelach 30 – 33.

Tabela 30. Trwałość ceftiofuru sodowego w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach do iniekcji

295 K			279 K		
Rozpuszczalnik	t [dni]	c [%]	Rozpuszczalnik	t [dni]	c [%]
Woda do iniekcji	0	100,00	Woda do iniekcji	0	100,00
	2	98,85		3	99,02
	6	97,62		12	97,13
	23	91,92		28	94,23
10% Roztwór glukozy	0	100,00	10% Roztwór glukozy	0	100,00
	2	98,40		3	99,28
	6	95,61		12	97,21
	23	82,87		28	91,35
20% Roztwór glukozy	0	100,00	20% Roztwór glukozy	0	100,00
	2	97,73		3	98,39
	6	92,27		12	94,96
	23	72,86		28	89,59
Mieszanka 5% roztworu glukozy i 0,9% roztworu chlorku sodu (2:1 V/V)	0	100,00	Mieszanka 5% roztworu glukozy i 0,9% roztworu chlorku sodu (2:1 V/V)	0	100,00
	2	98,14		3	99,32
	6	96,10		12	98,80
	23	87,33		28	97,05
Injectio Solutionis Ringeri	0	100,00	Injectio Solutionis Ringeri	0	100,00
	2	98,71		3	99,14
	6	97,78		12	97,76
	23	92,60		28	95,77
Solutio Ringeri Lactate	0	100,00	Solutio Ringeri Lactate	0	100,00
	2	99,18		3	99,46
	6	96,30		12	98,81
	23	87,65		28	97,56
Płyn fizjologiczny wieloelektrolitowy izotoniczny	0	100,00	Płyn fizjologiczny wieloelektrolitowy izotoniczny	0	100,00
	2	100,16		3	99,12
	6	Zmętnienie		12	98,04
				28	95,11
Płyn pediatryczny wyrównawczy	0	100,00	Płyn pediatryczny wyrównawczy	0	100,00
	2	99,56		3	99,65
	6	Zmętnienie		12	99,21
				28	98,12
0,9% Roztwór chlorku sodu	0	100,00	0,9% Roztwór chlorku sodu	0	100,00
	2	100,02		3	99,61
	6	Zmętnienie		12	99,02
				28	97,88
5% Roztwór glukozy	0	100,00	5% Roztwór glukozy	0	100,00
	2	100,15		3	99,02
	6	Zmętnienie		12	97,88
				28	94,79
Mieszanka 5% roztworu glukozy i 0,9 roztworu chlorku sodu (1:1 V/V)	0	100,00	Mieszanka 5% roztworu glukozy i 0,9% roztworu chlorku sodu (1:1 V/V)	0	100,00
	2	99,77		3	99,44
	6	Zmętnienie		12	98,72
				28	96,15

Tabela 31. Trwałość siarczanu cefkwinomu w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach do iniekcji

295 K			279 K		
Rozpuszczalnik	t [dni]	c [%]	Rozpuszczalnik	t [dni]	c [%]
Woda do iniekcji	0	100,00	Woda do iniekcji	0	100,00
	1	98,28		1	98,52
	3	96,42		3	96,53
	6	91,93		9	91,92
0,9 % Roztwór chlorku sodu	0	100,00	0,9% Roztwór chlorku sodu	0	100,00
	1	99,50		1	98,24
	3	99,90		3	96,30
	6	99,84		9	91,42
5% Roztwór glukozy	0	100,00	5% Roztwór glukozy	0	100,00
	1	98,20		1	98,12
	3	89,75		3	95,02
	6	78,88		9	90,81
10% Roztwór glukozy	0	100,00	10% Roztwór glukozy	0	100,00
	1	94,73		1	98,53
	3	85,69		3	96,30
	6	75,34		9	89,99
20% Roztwór glukozy	0	100,00	20% Roztwór glukozy	0	100,00
	1	96,46		1	98,30
	3	91,14		3	96,15
	6	82,41		9	92,10
Mieszanina 5% roztworu glukozy i 0,9% roztworu chlorku sodu (1:1 V/V)	0	100,00	Mieszanina 5% roztworu glukozy i 0,9% roztworu chlorku sodu (1:1 V/V)	0	100,00
	1	99,48		1	99,72
	3	96,41		3	97,32
	6	91,01		9	96,41
Mieszanina 5% roztworu glukozy i 0,9% roztworu chlorku sodu (2:1 V/V)	0	100,00	Mieszanina 5% roztworu glukozy i 0,9% roztworu chlorku sodu (2:1 V/V)	0	100,00
	1	96,41		1	99,55
	3	92,06		3	98,38
	6	81,73		9	92,27
Injectio Solutionis Ringeri	0	100,00	Injectio Solutionis Ringeri	0	100,00
	1	97,89		1	99,78
	3	92,27		3	97,58
	6	82,86		9	91,99
Solutio Ringeri Lactate	0	100,00	Solutio Ringeri Lactate	0	100,00
	1	97,88		1	98,66
	3	92,70		3	98,44
	6	86,12		9	93,56
Płyn fizjologiczny wieloelektrolitowy izotoniczny	0	100,00	Płyn fizjologiczny wieloelektrolitowy izotoniczny	0	100,00
	1	98,14		1	99,95
	3	95,72		3	98,11
	6	92,13		9	95,13
Płyn pediatryczny wyrównawczy	0	100,00	Płyn pediatryczny wyrównawczy	0	100,00
	1	97,13		1	98,16
	3	93,88		3	96,16
	6	87,81		9	93,69

Tabela 32. Wyniki badania trwałości ceftiofuru sodowego w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach do iniekcji po 0 i 30 dniach przechowywania w temperaturze 253 K

L.p.	Rozpuszczalnik	czas [dni]	c [%]
1.	Woda do iniekcji	0	100,00
		30	93,81
2.	0,9% Roztwór chlorku sodu	0	100,00
		30	89,99
3.	5% Roztwór glukozy	0	100,00
		30	94,34
4.	10% Roztwór glukozy	0	100,00
		30	98,10
5.	20% Roztwór glukozy	0	100,00
		30	94,89
6.	Mieszanka 5% roztworu glukozy i 0,9% roztworu chlorku sodu (1:1 V/V)	0	100,00
		30	97,60
7.	Mieszanka 5% roztworu glukozy i 0,9% roztworu chlorku sodu (2:1 V/V)	0	100,00
		30	97,99
8.	Injectio Solutionis Ringeri	0	100,00
		30	97,80
9.	Solutio Ringeri Lactate	0	100,00
		30	96,76
10.	Płyn fizjologiczny wieloelektrolitowy izotoniczny	0	100,00
		30	96,35
11.	Płyn pediatryczny wyrównawczy	0	100,00
		30	98,98

Tabela 33. Wyniki badania trwałości siarczanu cekwinomu w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach do iniekcji po 0 i 30 dniach przechowywania w temperaturze 253 K

L.p.	Rozpuszczalnik	czas [dni]	c [%]
1.	Woda do iniekcji	0	100,00
		30	95,10
2.	0,9% Roztwór chlorku sodu	0	100,00
		30	98,93
3.	5% Roztwór glukozy	0	100,00
		30	95,97
4.	10% Roztwór glukozy	0	100,00
		30	94,32
5.	20% Roztwór glukozy	0	100,00
		30	99,06
6.	Mieszanka 5% roztworu glukozy i 0,9% roztworu chlorku sodu (1:1 V/V)	0	100,00
		30	100,00
7.	Mieszanka 5% roztworu glukozy i 0,9% roztworu chlorku sodu (2:1 V/V)	0	100,00
		30	92,89
8.	Injectio Solutionis Ringeri	0	100,00
		30	99,51
9.	Solutio Ringeri Lactate	0	100,00
		30	100,00
10.	Płyn fizjologiczny wieloelektrolitowy izotoniczny	0	100,00
		30	98,46
11.	Płyn pediatryczny wyrównawczy	0	100,00
		30	100,00

#### 4.8. Ocena trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w fazie stałej

##### 4.8.1. Ocena trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu testem przyspieszonego starzenia

Do szklanych fiolek, pojemności 5 ml, odważono 5,0 mg badanego związku. Fiolki zawierające próbki preparatu przeznaczone do badania wpływu temperatury w atmosferze powietrza o wilgotności względnej RH 76,4%, umieszczono w eksykatorach zawierających nasycony roztwór chlorku sodu. Eksykatory umieszczono w komorach cieplnych o temperaturze odpowiednio 363 K, 353 K, 343 K i 333 K.

Próbki przeznaczone do badania wpływu temperatury w atmosferze powietrza o wilgotności względnej 0%, umieszczono w łaźni piaskowej. Łaźnie umieszczono w komorach cieplnych o temperaturze 383 K, 373 K, 363 K i 353 K w przypadku ceftiofuru sodowego oraz w temperaturze 393 K, 383 K, 373 K i 363 K w przypadku siarczanu cefkwinomu.

Wpływ wilgotności względnej powietrza (66,5%, 76,4% i 90%) wyznaczono w temperaturze 363 K (ceftiofur sodowy) lub 343 K (siarczan cefkwinomu).

W określonych odstępach czasu, zależnych od szybkości rozkładu, próbki wyjmowano z eksykatorów lub łaźni piaskowej. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej, próbki substancji badanej rozpuszczano w wodzie bidestylowanej. Roztwory przenoszono ilościowo do kolb miarowych i uzupełniono wodą do 25,0 ml. Otrzymane roztwory mieszano i sączono. Na kolumnę chromatograficzną wprowadzano po 50 µl analizowanych roztworów i rejestrowano chromatogramy.

##### 4.8.2. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu

W warunkach podwyższonej temperatury i podwyższonej wilgotności względnej powietrza rozkład ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu przebiegał według reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu. Dla prostoliniowych wykresów:

$$\ln P_t = \ln P_0 - k_{\text{obs}} \times t$$

metodą najmniejszych kwadratów, obliczono parametry równania  $y = ax + b$ .

Wyznaczono także dla poszczególnych warunków badania wartości  $t_{0,5}$  i  $t_{0,1}$ , z podanych poniżej wzorów:

$$t_{0,5} = 0,693/k$$

$$t_{0,1} = 0,1054/k$$

*Wpływ temperatury na szybkość rozkładu ceftiofuru sodowego (RH = 0% i 76,5%)*

Parametry kinetyczne oraz zbiorcze wykresy opisujące szybkość reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego przedstawiono w tabelach 34 – 35 i na rycinach 30 – 31.

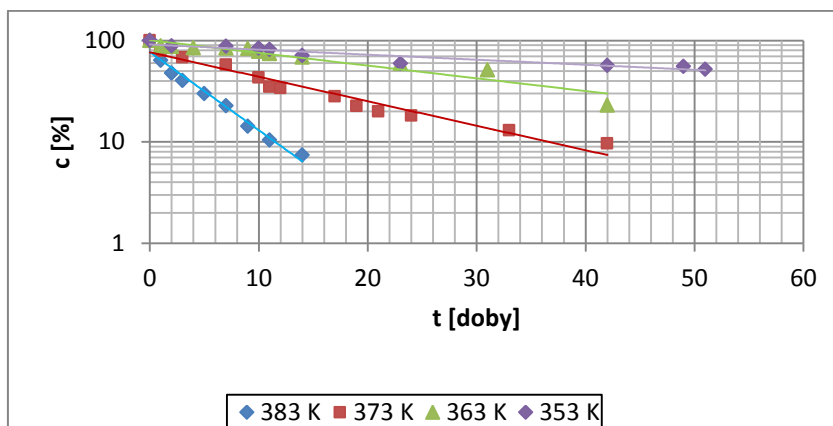
Tabela 34. Zmiany stężenia ceftiofuru sodowego przy RH 0%, w temperaturze 353 K, 363 K, 373 K i 383 K

T [K]	Czas [doby]	c[%]	Parametry kinetyczne
353	0	100,00	$a \pm \Delta a = -(0,0114 \pm 0,0032), \text{dni}^{-1}$ $S_a = 0,0014$ $b \pm \Delta b = 4,5128 \pm 0,0890$ $S_b = 0,0386$ $k \pm \Delta k = (1,33 \pm 0,37) \cdot 10^{-7}, \text{s}^{-1}$ $r = -0,9461$ $S_y = 0,0807$ $t_{0,5} = 60,31 \text{ dni}$ $t_{0,1} = 9,17 \text{ dni}$ $n = 10$
	2	88,54	
	7	87,52	
	10	83,93	
	11	81,35	
	14	70,93	
	23	59,25	
	42	56,62	
	49	55,45	
	51	51,96	
363	0	100,00	$a \pm \Delta a = -(0,0289 \pm 0,0066), \text{dni}^{-1}$ $S_a = 0,0030$ $b \pm \Delta b = 4,6131 \pm 0,1185$ $S_b = 0,0532$ $k \pm \Delta k = (3,34 \pm 0,77) \cdot 10^{-7}, \text{s}^{-1}$ $r = -0,9507$ $S_y = 0,1280$ $t_{0,5} = 24,01 \text{ dni}$ $t_{0,1} = 3,65 \text{ dni}$ $n = 12$
	1	88,49	
	2	87,40	
	4	84,92	
	7	84,03	
	9	83,66	
	10	77,94	
	11	74,03	
	14	68,53	
	23	59,41	
	31	51,35	
	42	23,05	
373	0	100,00	$a \pm \Delta a = -(0,0555 \pm 0,0083), \text{dni}^{-1}$ $S_a = 0,0038$ $b \pm \Delta b = 4,3364 \pm 0,1617$ $S_b = 0,0734$ $k \pm \Delta k = (6,43 \pm 0,96) \cdot 10^{-7}, \text{s}^{-1}$ $r = -0,9756$ $S_y = 0,1627$ $t_{0,5} = 12,47 \text{ dni}$ $t_{0,1} = 1,90 \text{ dni}$ $n = 13$
	1	78,71	
	3	68,06	
	7	57,76	
	10	43,07	
	11	34,91	
	12	33,84	
	17	28,12	
	19	22,59	
	21	19,96	
	24	18,13	
	33	13,01	
	42	9,65	
383	0	100,0	$a \pm \Delta a = -(0,1773 \pm 0,0239), \text{dni}^{-1}$ $S_a = 0,0101$ $b \pm \Delta b = 4,3406 \pm 0,1758$ $S_b = 0,0743$ $k \pm \Delta k = (2,05 \pm 0,28) \cdot 10^{-6}, \text{s}^{-1}$ $r = -0,9888$ $S_y = 0,1377$ $t_{0,5} = 3,91 \text{ dni}$ $t_{0,1} = 0,59 \text{ dni}$ $n = 9$
	1	63,93	
	2	47,77	
	3	40,29	
	5	29,84	
	7	22,7	
	9	14,23	
	11	10,39	
	14	7,43	

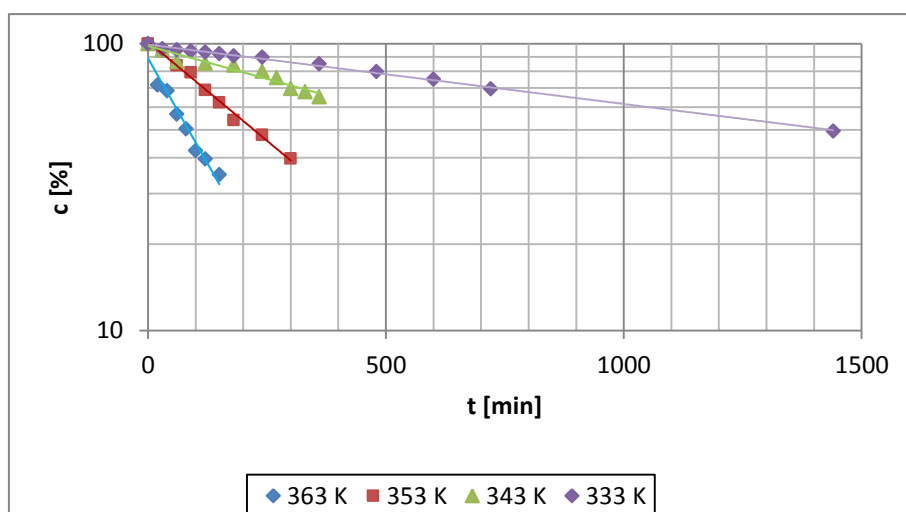
Tabela 35. Zmiany stężenia ceftiofuru sodowego przy RH ~76,4%, w temperaturze 353 K, 363 K, 373 K i 383 K

T [K]	t [min]	c [%]	Parametry kinetyczne
333	0	100,00	$a \pm \Delta a = -(0,0005 \pm 1,89) \cdot 10^{-5}, \text{min}^{-1}$ $S_a = 8,60 \cdot 10^{-6}$ $b \pm \Delta b = 4,5975 \pm 0,0098$ $S_b = 0,0044$ $k \pm \Delta k = (7,95 \pm 0,32) \cdot 10^{-6}, \text{s}^{-1}$ $r = -0,9982$ $S_y = 0,0120$ $t_{0,5} = 24,21 \text{ h}$ $t_{0,1} = 3,68 \text{ h}$ $n = 13$
	30	96,00	
	60	95,30	
	90	94,37	
	120	93,65	
	150	92,44	
	180	90,61	
	240	89,87	
	360	84,96	
	480	79,96	
	600	75,23	
	720	69,65	
1440	49,56		
343	0	100,00	$a \pm \Delta a = -(0,0011 \pm 0,0002), \text{min}^{-1}$ $S_a = 9,40 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = 4,5864 \pm 0,0490$ $S_b = 0,0212$ $k \pm \Delta k = (1,76 \pm 0,36) \cdot 10^{-5}, \text{s}^{-1}$ $r = -0,9697$ $S_y = 0,0068$ $t_{0,5} = 10,94 \text{ h}$ $t_{0,1} = 1,66 \text{ h}$ $n = 10$
	30	95,21	
	60	86,65	
	120	85,49	
	180	84,22	
	240	80,13	
	270	76,21	
	300	69,85	
	330	68,11	
	360	65,24	
353	0	100,00	$a \pm \Delta a = -(0,0032 \pm 0,0002), \text{min}^{-1}$ $S_a = 7,61 \cdot 10^{-5}$ $b \pm \Delta b = 4,6212 \pm 0,0287$ $S_b = 0,0121$ $k \pm \Delta k = (5,26 \pm 0,30) \cdot 10^{-5}, \text{s}^{-1}$ $r = -0,9980$ $S_y = 0,0212$ $t_{0,5} = 3,66 \text{ h}$ $t_{0,1} = 0,56 \text{ h}$ $n = 9$
	30	94,13	
	60	83,91	
	90	79,42	
	120	68,99	
	150	62,31	
	180	56,14	
	240	48,11	
	300	39,79	
363	0	100,0	$a \pm \Delta a = -(0,0067 \pm 0,0013), \text{min}^{-1}$ $S_a = 0,0005$ $b \pm \Delta b = 4,4869 \pm 0,1151$ $S_b = 0,0470$ $k \pm \Delta k = (1,12 \pm 0,22) \cdot 10^{-4}, \text{s}^{-1}$ $r = -0,9807$ $S_y = 0,0741$ $t_{0,5} = 1,72 \text{ h}$ $t_{0,1} = 0,26 \text{ h}$ $n = 8$
	20	71,84	
	40	68,52	
	60	56,83	
	80	50,51	
	100	42,43	
	120	39,63	
	150	34,98	





Rycina 30. Półlogarytmiczne wykresy  $c$  [%] =  $f(t)$  reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w fazie stałej przy  $RH = 0\%$ , w temperaturze 353 K, 363 K, 373 K i 383 K.



Rycina 31. Półlogarytmiczne wykresy  $c$  [%] =  $f(t)$  reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w fazie stałej przy  $RH 76,4\%$ , w temperaturze 333 K, 343 K, 353 K i 363 K.

*Wpływ temperatury na szybkość rozkładu siarczanu cefkwinomu (RH = 76,5% i 0%)*

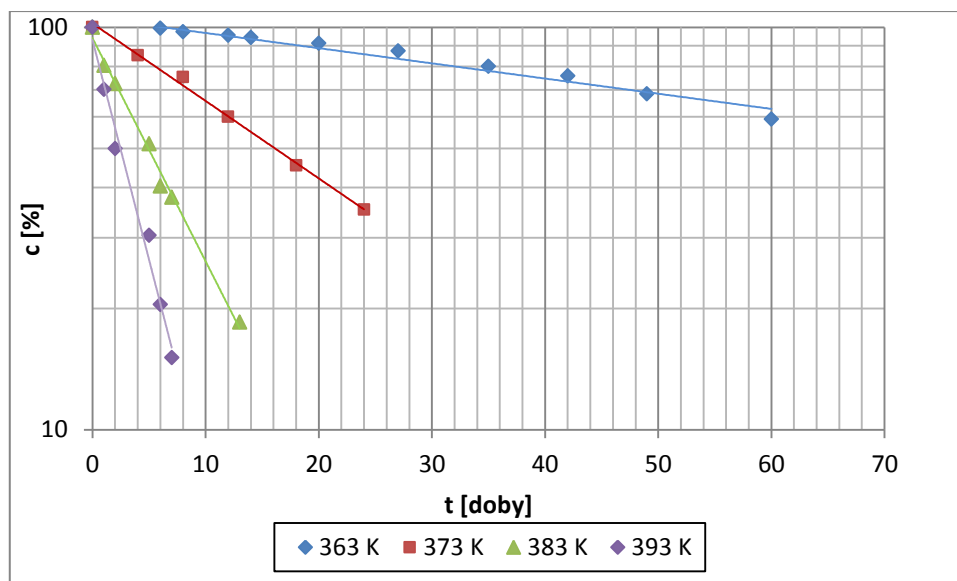
Parametry kinetyczne oraz zbiorcze wykresy opisujące szybkość reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomu przedstawiono w tabelach 36 – 37 i na rycinach 32 – 33.

Tabela 36. Zmiany stężenia siarczanu cefkwinomu przy RH = 0%, w temperaturze 363 K, 373 K, 383 K i 393 K

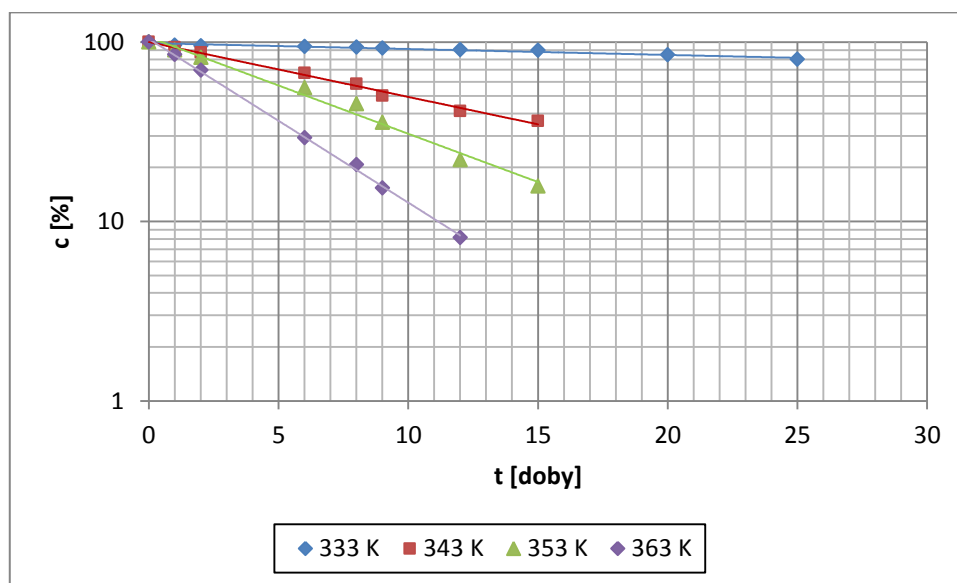
T [K]	Czas [doby]	c[%]	Parametry kinetyczne
363	0	100,00	$a \pm \Delta a = -(0,0086 \pm 0,0013), \text{doba}^{-1}$ $S_a = 0,0006; S_b = 0,0178$ $k \pm \Delta k = (1,00 \pm 0,32) \cdot 10^{-7}, \text{s}^{-1}$ $r = -0,9807$ $S_y = 0,0354$ $t_{0,5} = 80,21 \text{ dni}; t_{0,1} = 12,20 \text{ dni}$ $n = 11$
	6	99,49	
	8	97,46	
	12	95,56	
	14	94,36	
	20	91,35	
	27	87,36	
	35	79,96	
	42	75,68	
	49	68,36	
60	59,12		
373	0	100,00	$a \pm \Delta a = -(0,0443 \pm 0,0038), \text{doba}^{-1}$ $S_a = 0,0014; S_b = 0,0188$ $k \pm \Delta k = (5,13 \pm 0,39) \cdot 10^{-7}, \text{s}^{-1}$ $r = -0,9980$ $S_y = 0,027$ $t_{0,5} = 15,63 \text{ dni}; t_{0,1} = 2,38 \text{ dni}$ $n = 6$
	4	85,23	
	8	75,21	
	12	59,94	
	18	45,36	
	24	35,21	
383	0	100,00	$a \pm \Delta a = -(0,1277 \pm 0,0123), \text{doba}^{-1}$ $S_a = 0,004; S_b = 0,0306$ $k \pm \Delta k = (1,48 \pm 0,14) \cdot 10^{-6}, \text{s}^{-1}$ $r = -0,9964$ $S_y = 0,052$ $t_{0,5} = 5,42 \text{ dni}; t_{0,1} = 0,82 \text{ dni}$ $n = 7$
	1	80,40	
	2	72,47	
	5	51,39	
	6	40,36	
	7	37,82	
13	18,53		
393	0	100,0	$a \pm \Delta a = -(0,2514 \pm 0,0448), \text{doba}^{-1}$ $S_a = 0,0161; S_b = 0,0707$ $k \pm \Delta k = (2,91 \pm 0,46) \cdot 10^{-6}, \text{s}^{-1}$ $r = -0,9918$ $S_y = 0,1039$ $t_{0,5} = 2,76 \text{ dni}; t_{0,1} = 0,42 \text{ dni}$ $n = 6$
	1	70,12	
	2	49,98	
	5	30,45	
	6	20,47	
	7	15,11	

Tabela 37. Zmiany stężenia siarczanu cefkwinommu przy RH ~76,4% w temperaturze 333 K, 343 K, 353 K i 363 K

T [K]	t [dni]	c [%]	Parametry kinetyczne
333	0	100,00	$a \pm \Delta a = -(0,0322 \pm 0,0029), \text{doba}^{-1}$ $S_a = 1,2 \cdot 10^{-3}$ $S_b = 0,0158$ $k \pm \Delta k = (3,73 \pm 0,36) \cdot 10^{-7}, \text{s}^{-1}$ $r = -0,9939$ $S_y = 0,0120$ $t_{0,5} = 21,50 \text{ dni}$ $t_{0,1} = 3,27 \text{ dni}$ $n = 10$
	1	96,00	
	2	95,30	
	6	94,37	
	8	93,65	
	9	92,44	
	12	90,61	
	15	89,87	
	20	84,96	
25	79,96		
343	0	100,00	$a \pm \Delta a = -(0,0703 \pm 0,0062), \text{doba}^{-1}$ $S_a = 2,5 \cdot 10^{-3}$ $S_b = 0,0211$ $k \pm \Delta k = (8,14 \pm 0,72) \cdot 10^{-7}, \text{s}^{-1}$ $r = -0,9961$ $S_y = 0,0360$ $t_{0,5} = 9,85 \text{ dni}$ $t_{0,1} = 1,50 \text{ dni}$ $n = 8$
	1	93,21	
	2	87,32	
	6	67,01	
	8	58,32	
	9	50,12	
	12	41,25	
	15	36,32	
353	0	100,00	$a \pm \Delta a = -(0,1238 \pm 0,0145), \text{doba}^{-1}$ $S_a = 2,5 \cdot 10^{-3}$ $S_b = 0,0495$ $k \pm \Delta k = (1,43 \pm 0,17) \cdot 10^{-6}, \text{s}^{-1}$ $r = -0,9931$ $S_y = 0,0850$ $t_{0,5} = 5,61 \text{ dni}$ $t_{0,1} = 0,85 \text{ dni}$ $n = 8$
	1	90,12	
	2	81,95	
	6	55,53	
	8	45,23	
	9	35,63	
	12	22,07	
	15	15,78	
363	0	100,0	$a \pm \Delta a = -(0,2099 \pm 0,0092), \text{doba}^{-1}$ $S_a = 3,6 \cdot 10^{-3}$ $S_b = 0,0247$ $k \pm \Delta k = (2,43 \pm 0,10) \cdot 10^{-6}, \text{s}^{-1}$ $r = -0,9992$ $S_y = 0,0741$ $t_{0,5} = 3,30 \text{ dni}$ $t_{0,1} = 0,50 \text{ dni}$ $n = 7$
	1	85,11	
	2	69,63	
	6	29,35	
	8	20,75	
	9	15,37	
	12	8,12	



Rycina 32. Półlogarytmiczne wykresy  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu siarczanu cefkwinoemu w fazie stałej przy RH = 0%, w temperaturze 363 K, 373 K, 383 K i 393 K.



Rycina 33. Półlogarytmiczne wykresy  $c [\%] = f(t)$  reakcji rozkładu siarczanu cefkwinoemu w fazie stałej przy RH 76,4%, w temperaturze 333 K, 343 K, 353 K i 363 K.

*Wpływ wilgotności względnej powietrza na rozkład ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w fazie stałej*

Wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość ceftiofuru sodowego badano w temperaturze 363 K, natomiast siarczanu cefkwinomu, w temperaturze 343 K. Do uzyskania odpowiedniej wilgotności względnej powietrza zastosowano nasycone roztwory soli nieorganicznych:

- azotanu sodu, RH ~66,5%
- chlorku sodu, RH ~76,4%
- siarczanu cynku, RH ~90,0%

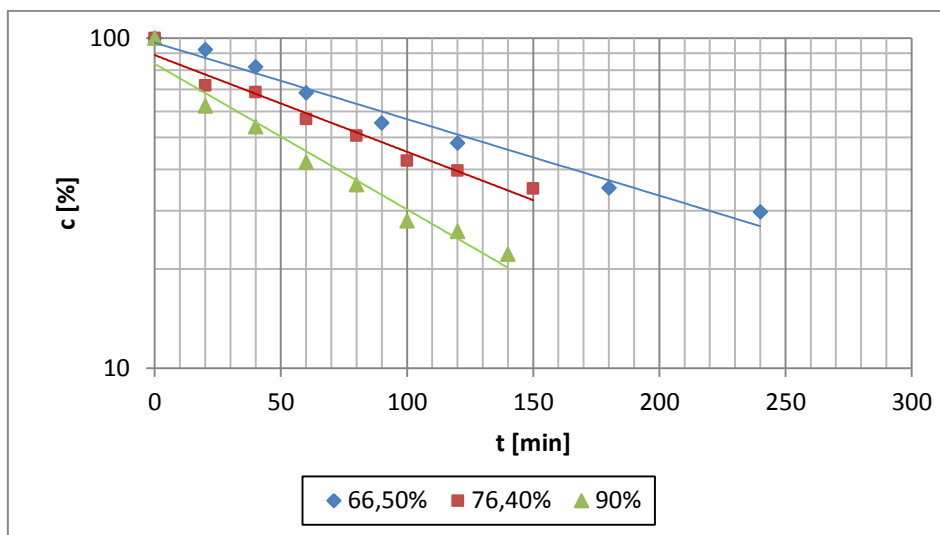
Zmiany stężenia badanych cefalosporyn w podanych powyżej warunkach przedstawiono w tabelach 38 – 39 i na rycinach 34 – 35.

Tabela 38. Zmiany stężenia ceftiofuru sodowego przy RH 66,5%, RH 76,4%, RH 90%, w temperaturze 363 K

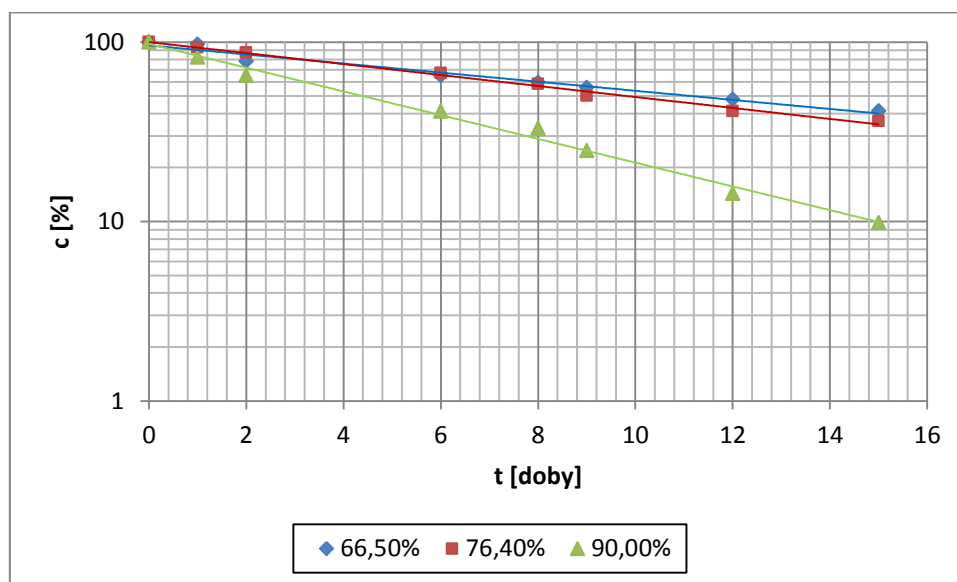
RH [%]	t [min]	c [%]	Parametry kinetyczne
66,5	0	100,00	$a \pm \Delta a = -(0,0053 \pm 0,0008), \text{ min}^{-1}$ $S_a = 0,0003$ $b \pm \Delta b = 4,5739 \pm 0,0963$ $S_b = 0,0394$ $k \pm \Delta k = (8,89 \pm 1,32) \cdot 10^{-5}, \text{ s}^{-1}$ $r = -0,9891; S_y = 0,0708$ $t_{0,5} = 2,16 \text{ h}; t_{0,1} = 0,33 \text{ h}$ $n = 8$
	20	92,22	
	40	81,78	
	60	68,12	
	90	55,31	
	120	48,02	
	180	35,16	
	240	29,72	
76,4	0	100,00	$a \pm \Delta a = -(0,0067 \pm 0,0013), \text{ min}^{-1}$ $S_a = 0,0005$ $b \pm \Delta b = 4,4870 \pm 0,1151$ $S_b = 0,0470$ $k \pm \Delta k = (1,12 \pm 0,22) \cdot 10^{-4}, \text{ s}^{-1}$ $r = -0,9807; S_y = 0,0741$ $t_{0,5} = 1,72 \text{ h}; t_{0,1} = 0,26 \text{ h}$ $n = 8$
	20	71,84	
	40	68,52	
	60	56,83	
	80	50,51	
	100	42,43	
	120	39,63	
	150	34,98	
90,0	0	100,00	$a \pm \Delta a = -(0,0099 \pm 0,0015), \text{ min}^{-1}$ $S_a = 0,0006$ $b \pm \Delta b = 4,4154 \pm 0,1451$ $S_b = 0,0613$ $k \pm \Delta k = (1,65 \pm 0,25) \cdot 10^{-4}, \text{ s}^{-1}$ $r = -0,9856; S_y = 0,0998$ $t_{0,5} = 1,16 \text{ h}; t_{0,1} = 0,18 \text{ h}$ $n = 9$
	20	62,20	
	40	53,85	
	60	41,99	
	80	35,89	
	100	27,88	
	120	25,92	
	140	22,14	
	160	17,61	

Tabela 39. Zmiany stężenia siarczanu cefkwinomu przy RH 66,5%, RH 76,4%, RH 90%, w temperaturze 343 K

RH [%]	t [doby]	c [%]	Parametry kinetyczne
66,5	0	100,00	$a \pm \Delta a = -(0,058 \pm 0,009), \text{ min}^{-1}$ $S_a = 0,0038$ $S_b = 0,0317$ $k \pm \Delta k = (6,74 \pm 1,07) \cdot 10^{-7}, \text{ s}^{-1}$ $r = -0,9874; S_y = 0,0540$ $t_{0,5} = 11,90 \text{ dni}; t_{0,1} = 1,81 \text{ dni}$ $n = 8$
	1	97,15	
	2	78,10	
	6	64,98	
	8	59,63	
	9	55,84	
	12	47,85	
	15	41,35	
76,4	0	100,00	$a \pm \Delta a = -(0,0700 \pm 0,0062), \text{ min}^{-1}$ $S_a = 0,0025$ $S_b = 0,0211$ $k \pm \Delta k = (8,14 \pm 0,72) \cdot 10^{-7}, \text{ s}^{-1}$ $r = -0,9961; S_y = 0,036$ $t_{0,5} = 9,85 \text{ dni}; t_{0,1} = 1,50 \text{ dni}$ $n = 8$
	1	93,21	
	2	87,32	
	6	67,01	
	8	58,32	
	9	50,12	
	12	41,25	
	15	36,32	
90,0	0	100,00	$a \pm \Delta a = -(0,1523 \pm 0,0139), \text{ min}^{-1}$ $S_a = 0,0057$ $S_b = 0,0613$ $k \pm \Delta k = (1,76 \pm 0,16) \cdot 10^{-6}, \text{ s}^{-1}$ $r = -0,9958; S_y = 0,0816$ $t_{0,5} = 4,56 \text{ dni}; t_{0,1} = 0,69 \text{ dni}$ $n = 8$
	1	82,35	
	2	65,30	
	6	41,25	
	8	33,11	
	9	24,85	
	12	14,36	
	15	9,85	



Rycina 34. Zmiany stężenia ceftiofuru sodowego przy RH 66,5%, RH 76,4%, RH 90%, w temperaturze 363 K.



Rycina 35. Zmiany stężenia siarczianu cefkwinomu przy RH 66,5%, RH 76,4%, RH 90%, w temperaturze 343 K.





## 5. OMÓWIENIE WYNIKÓW

---

Jednym z warunków bezpiecznej farmakoterapii jest odpowiednia jakość leku oraz jego trwałość. Jest to także warunek skutecznej farmakoterapii zwierząt. W badaniach trwałości wykorzystuje się testy stresowe, przyspieszone oraz długoterminowe. Testy przyspieszone oraz długoterminowe są szeroko stosowane w przemyśle farmaceutycznym do ustalenia okresu ważności leku, czyli okresu, w którym lek może być stosowany przez pacjenta. W badaniach naukowych częściej stosuje się testy stresowe, pozwalające ocenić podatność badanej substancji na zmiany pod wpływem zastosowanych czynników destrukcyjnych, takich jak: stężenie jonów wodorowych, światło, rodzaj i stężenie składników buforu, siła jonowa oraz wilgotność względna powietrza i temperatura.

Cefalosporyny, stosowane u ludzi, a także u zwierząt, są podatne na rozkład pod wpływem czynników fizycznych i chemicznych w roztworach wodnych i w fazie stałej. Szybkość i kierunek procesu degradacji zależy w dużym stopniu od budowy chemicznej cefalosporyn, a powstające produkty rozkładu najczęściej nie wykazują aktywności bakteriobójczej, a często są odpowiedzialne za ich działania niepożądane. Prawidłowo przeprowadzone badania trwałości potwierdzają, że lek zachowa pełną skuteczność do końca okresu jego ważności.

Celem moich badań było określenie trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w roztworach wodnych oraz w fazie stałej. Obie cefalosporyny są przeznaczone do stosowania u zwierząt.

Zaplanowane badania trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu obejmowały:

- opracowanie i walidację metody HPLC odpowiedniej do badania trwałości w roztworach wodnych i w fazie stałej
- określenie kinetycznego mechanizmu rozkładu w roztworach wodnych i fazie stałej
- ocenę trwałości w roztworach wodnych, w warunkach ogólnej i właściwej katalizy kwasowo-zasadowej

- ocenę trwałości w roztworach do podania parenteralnego
- ocenę trwałości w fazie stałej, obejmującą wpływ temperatury w atmosferze powietrza o wilgotności względnej 0% i 76,4% oraz wpływ wilgotności względnej powietrza

Przeprowadzone badania trwałości pozwoliły na wyznaczenie obserwowanych stałych szybkości reakcji rozkładu w podanych warunkach, na opisanie zależności  $\log k_{pH} = f(pH)$  odpowiednimi równaniami, a także na wyznaczenie parametrów termodynamicznych reakcji rozkładu w fazie stałej.

#### *Metoda analityczna*

Ocena trwałości substancji do celów farmaceutycznych jest możliwa wówczas gdy w badaniach zostaną zastosowane odpowiednie metody analityczne, umożliwiające śledzenie zmian stężenia substratu w obecności powstających produktów rozkładu, często o zbliżonej budowie chemicznej. Metody stosowane w badaniach trwałości muszą być uprzednio zwalidowane.

W badaniach trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu zastosowano metodę HPLC, o parametrach rozdzielania opisanych w rozdziale 4.4.

Przeprowadzona walidacja metod wykazała, że są one:

- selektywne – umożliwiają oznaczenie zmian stężenia ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w roztworach wodnych i w fazie stałej, w obecności powstających produktów rozkładu
- liniowe w badanych zakresach stężeń (0,04 – 0,30 mg/ml)
  - ceftiofur sodowy;  $y = (3,50 \pm 0,17) \cdot 10^7 \cdot x$ ;  $r = 0,9982$ ;  $n = 10$ ; tabela 11
  - siarczan cefkwinomu;  $y = (7,65 \pm 0,26) \cdot 10^7 \cdot x$ ;  $r = 0,9988$ ;  $n = 10$ ; tabela 12
- precyzyjne; wartości RSD < 5%
  - ceftiofur sodowy; RSD = 0,95% – 1,96%
  - siarczan cefkwinomu; RSD = 1,01%
- czułe, bowiem możliwe jest rejestrowanie wartości mierzonej przy niewielkiej zmianie wartości oznaczanej

### *Trwałość ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w roztworach wodnych*

Badania trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w roztworach wodnych polegały na:

- wyznaczeniu obserwowanych stałych szybkości reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w temperaturze 323 K, w zakresie pH od 0,44 do 13,57 oraz siarczanu cefkwinomu w temperaturze 343 K, w zakresie pH od 0,45 do 13,37
- wyznaczeniu stałych  $k_{pH}$ , charakteryzujących właściwą katalizę kwasowo-zasadową
- opisanu zależności  $\log k_{pH} = f(pH)$  odpowiednim równaniem kinetycznym
- obliczeniu katalitycznych stałych szybkości reakcji cząstkowych.

Badania prowadzono przy stałej wartości siły jonowej ( $\mu = 0,50$  mol/l).

W roztworach wodorotlenku sodu, badania prowadzono w niższych temperaturach, a następnie uzyskane wyniki ekstrapolowano do temperatury 323 K (ceftiofur sodowy) lub 343 K (siarczan cefkwinomu).

### *Obserwowane stałe szybkości reakcji*

Obserwowane stałe szybkości reakcji pseudopierwszego rzędu wyznaczono metodą HPLC z równania  $\ln P_t = \ln P_0 - k_{obs} \times t$ . Półlogarytmiczne wykresy  $c, \% = f(t)$  były prostoliniowe. Dla każdej prostej wyznaczono parametry kinetyczne reakcji, stosując arkusz kalkulacyjny Excel.

### *Ogólna kataliza kwasowo-zasadowa*

Na szybkość rozkładu związku w roztworach wodnych może wpływać nie tylko stężenie jonów wodorowych i wodorotlenowych, ale także rozpuszczalniki i składniki roztworów buforowych. Jeżeli przy stałej wartości pH i siły jonowej, przy różnych stężeniach składników buforów, szybkość reakcji zmienia się ze zmianą stężenia buforu, mamy wówczas do czynienia z ogólną katalizą kwasowo-zasadową. Aby potwierdzić bądź wykluczyć występowanie ogólnej katalizy kwasowo-zasadowej (w roztworach buforowych – octanowym, fosforanowych i boranowym), wyznaczono obserwowane stałe szybkości rozkładu dla 3 lub 4 stężeń składników danego buforu, przy skrajnych wartościach pH, zachowując stałą wartość siły jonowej równą 0,50 mol/l. Dla wykluczenia bądź potwierdzenia występowania ogólnej katalizy kwasowo-zasadowej, zastosowano test równoległości.

Stwierdzono, że efekt katalityczny wykazują:

- składniki buforu fosforanowego (pH 1,54 – 2,95) – ceftiofur sodowy, siarczan cefkwinomu
- składniki buforu octanowego (pH 3,66 – 5,47) – siarczan cefkwinomu
- składniki buforu boranowego (pH 7,52 – 10,48) – siarczan cefkwinomu

Zatem wyznaczone obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu w powyżej podanych buforach i zakresach pH są równe:

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{pH}} + k_{\text{B}} \cdot [\text{B}]_{\text{T}}$$

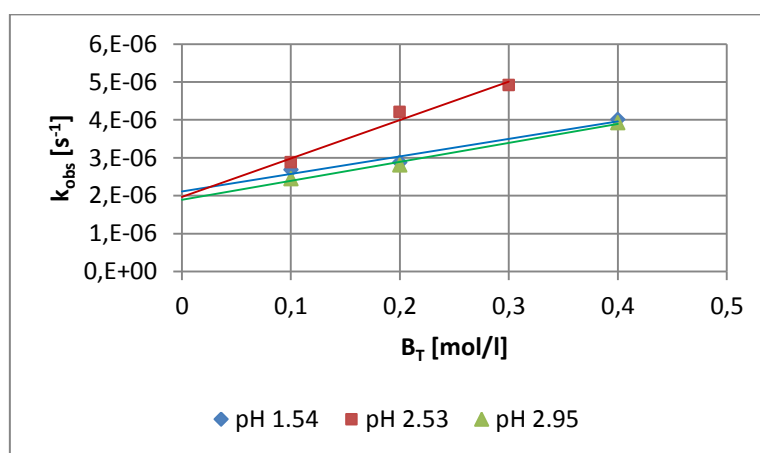
gdzie:

$k_{\text{pH}}$  stała szybkości reakcji rozkładu charakteryzująca właściwą katalizę kwasowo-zasadową

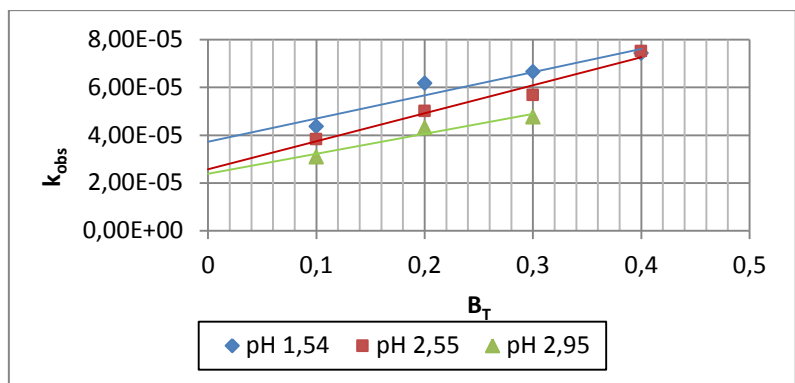
$k_{\text{B}}$  stała szybkości reakcji rozkładu, opisująca efekt katalityczny składników buforu

$[\text{B}]_{\text{T}}$  całkowite stężenie składników buforu

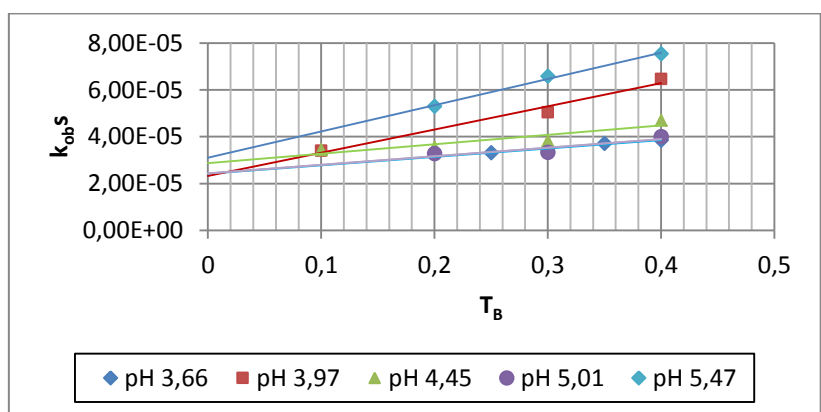
Celem wyznaczenia wartości  $k_{\text{pH}}$  i  $k_{\text{B}}$ , wykonano wykresy  $k_{\text{obs}} = f([\text{B}]_{\text{T}})$ , które były prostoliniowe (Rycina 36 – 39). Nachylenie tych wykresów ( $a$ ) jest równe wartości  $k_{\text{B}}$ , charakteryzującej efekt katalityczny składników danego buforu, natomiast odcinek rzędnej dla  $[\text{B}]_{\text{T}} = 0$  odpowiada wartości  $k_{\text{pH}}$ , charakteryzującej właściwą katalizę kwasowo-zasadową.



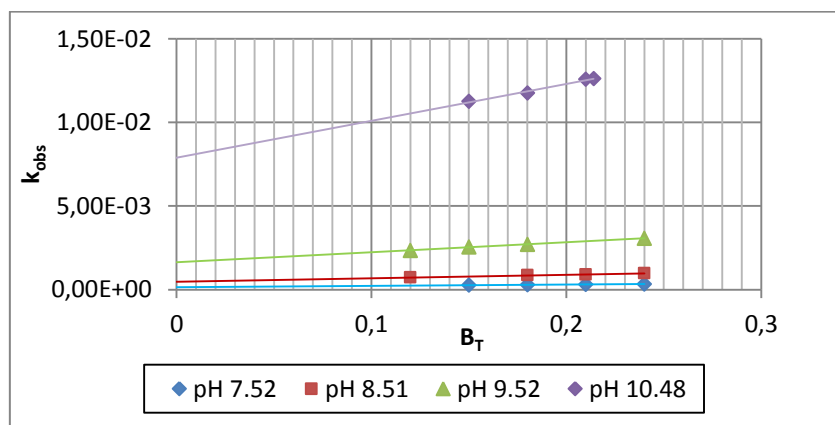
Rycina 36. Wykresy zależności  $k_{\text{obs}} = f([\text{B}]_{\text{T}})$  reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w buforze fosforanowym (pH 1,54 – 2,95), w temperaturze 323 K.



Rycina 37. Wykresy zależności  $k_{obs} = f([B]_T)$  reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomu w buforze fosforanowym (pH 1,54 – 2,95), w temperaturze 343 K.



Rycina 38. Wykresy zależności  $k_{obs} = f([B]_T)$  reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomu w buforze octanowym (pH 3,66 – 5,47), w temperaturze 343 K.



Rycina 39. Wykresy zależności  $k_{obs} = f([B]_T)$  reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomu w buforze boranowym (pH 7,52 – 10,48), w temperaturze 343 K.

W buforze fosforanowym (pH 1,54 – 2,95)

$$k_B [B]_T = k_{H_3PO_4} [H_3PO_4] + k_{H_2PO_4^-} [H_2PO_4^-]$$

Po podzieleniu stron powyższego równania przez  $[B]_T$  otrzymano

$$k_B = k_{H_3PO_4} f_{H_3PO_4} + k_{H_2PO_4^-} f_{H_2PO_4^-}$$

gdzie:

$f_{H_3PO_4}$  i  $f_{H_2PO_4^-}$  oznaczają odpowiednio ułamki stężeń kwasu fosforowego i jonów diwodorofosforanowych w roztworze.

$$f_{H_3PO_4} + f_{H_2PO_4^-} = 1$$

$$f_{H_3PO_4} = a_{H^+} / (a_{H^+} + K_{a1}) = 1 / (1 + 10^{(pH - pK_{a1})})$$

$$f_{H_2PO_4^-} = K_{a1} / (a_{H^+} + K_{a1}) = 1 / (1 + 10^{(pK_{a1} - pH)})$$

stąd

$$k_{obs} = k_{pH} + B_T \frac{k_{H_3PO_4} [H^+] + k_{H_2PO_4^-} K_a}{[H^+] + K_a}$$

W buforze octanowym w zakresie pH 3,65 – 5,48

$$k_B = k_{CH_3COOH} f_{CH_3COOH} + k_{CH_3COO^-} f_{CH_3COO^-}$$

$$f_{CH_3COOH} + f_{CH_3COO^-} = 1$$

zatem,

$$k_{obs} = k_{pH} + B_T \frac{k_{CH_3COOH} [H^+] + k_{CH_3COO^-} K_a}{[H^+] + K_a}$$

W buforze boranowym, w zakresie pH 7,49 – 10,70

$$k_B = k_{H_3BO_3} f_{H_3BO_3} + k_{BO_2^-} f_{BO_2^-}$$

$$f_{H_3BO_3} + f_{BO_2^-} = 1$$

a zatem,

$$k_{obs} = k_{pH} + B_T \frac{k_{H_3BO_3} [H^+] + k_{BO_2^-} K_a}{[H^+] + K_a}$$

Z odpowiednich równań wyznaczono katalityczne stałe szybkości opisujące efekt katalityczny poszczególnych składników buforów. Stałe te wynoszą odpowiednio:

Ceftiofur sodowy	Siarczan cefkwinomu
$k_{\text{H}_3\text{PO}_4} = 1,08 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{H}_3\text{PO}_4} = 1.02 \cdot 10^{-4} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$k_{\text{H}_2\text{PO}_4^-} = 1,66 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{H}_2\text{PO}_4^-} = 8.09 \cdot 10^{-5} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	$k_{\text{CH}_3\text{COOH}} = 4.64 \cdot 10^{-5} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	$k_{\text{CH}_3\text{COO}^-} = 6.76 \cdot 10^{-4} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	$k_{\text{H}_3\text{BO}_3} = 5.97 \cdot 10^{-3} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	$k_{\text{BO}_2^-} = 1.43 \cdot 10^{-4} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$

W pozostałych badanych roztworach występowała właściwa kataliza kwasowo-zasadowa, czyli w tych roztworach  $k_{\text{obs}} = k_{\text{pH}}$ .

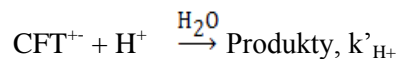
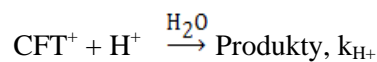
#### *Właściwa kataliza kwasowo-zasadowa*

Do interpretacji wpływu pH na trwałość ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu wykorzystano wyznaczone wartości  $k_{\text{pH}}$ .

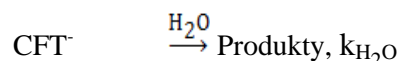
#### *Ceftiofur sodowy (CFT)*

Wykres zależności  $\log k_{\text{pH}} = f(\text{pH})$  dla ceftiofuru sodowego (Rycina 40) wskazuje, że w roztworach wodnych, przy zerowym stężeniu składników buforów, możliwe są następujące reakcje:

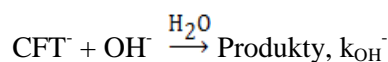
- hydroliza monokationów i jonów obojnaczych CFT katalizowana jonami wodorowymi ( $k_{\text{H}^+}$  i  $k'_{\text{H}^+}$ )



- spontaniczna hydroliza monoanionów CFT pod wpływem wody ( $k_{\text{H}_2\text{O}}$ )



- hydroliza monoanionów CFT katalizowana jonami wodorotlenowymi ( $k_{\text{OH}^-}$ )



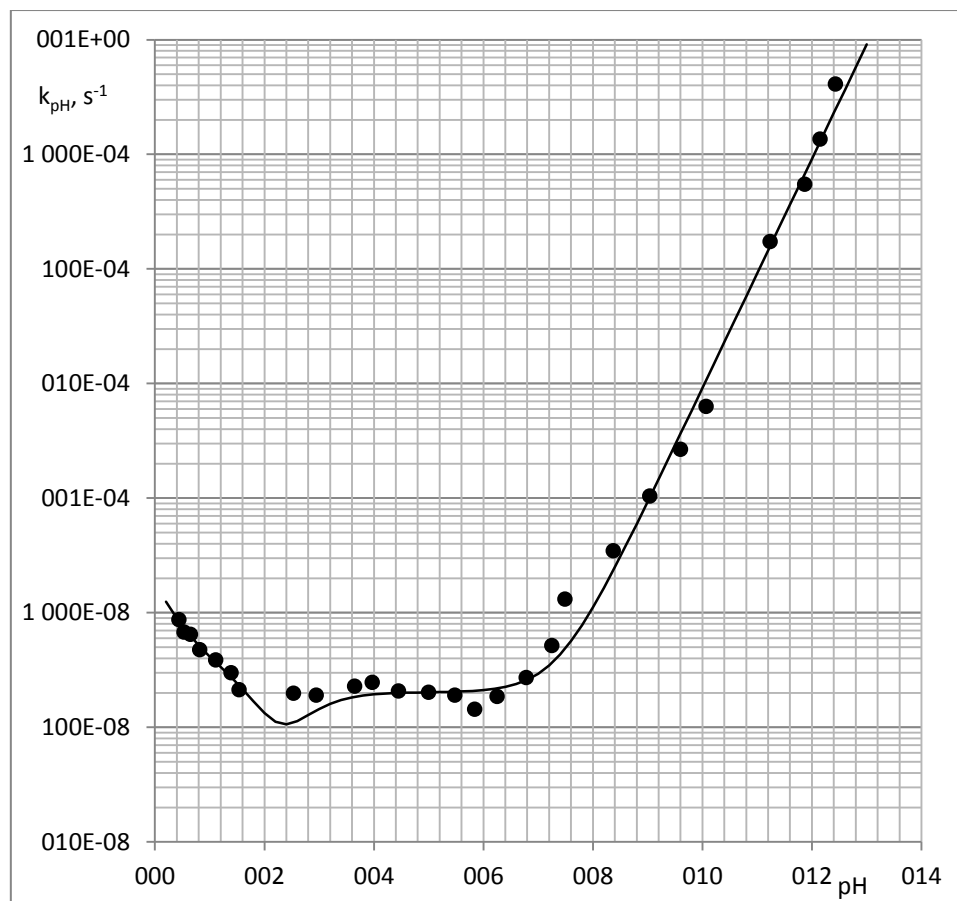
Całkowita szybkość reakcji jest równa sumie cząstkowych stałych szybkości powyższych reakcji:

$$k_{pH} = k_{H^+} a_{H^+} f_1 + k'_{H^+} a_{H^+} f_2 + k_{H_2O} f_3 + k_{OH^-} a_{OH^-} f_3$$

gdzie:

$a_{H^+}$  i  $a_{OH^-}$  – aktywność jonów wodorowych i wodorotlenowych

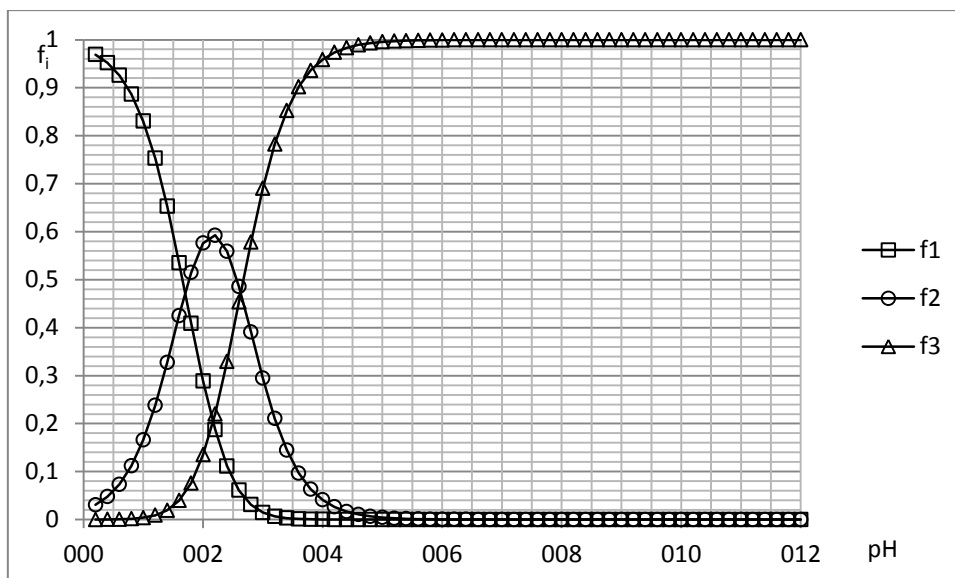
$f_1$ - $f_3$  – ułamki stężeń monokationów ( $f_1$ ), jonów obojnaczych ( $f_2$ ) i monoanionów ( $f_3$ ) CFT



Rycina 40. Półlogarytmiczna zależność  $k_{pH} = f(pH)$  reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w roztworach wodnych, w temperaturze 323 K. Punktory – wartości doświadczalne, linia ciągła – profil teoretyczny.

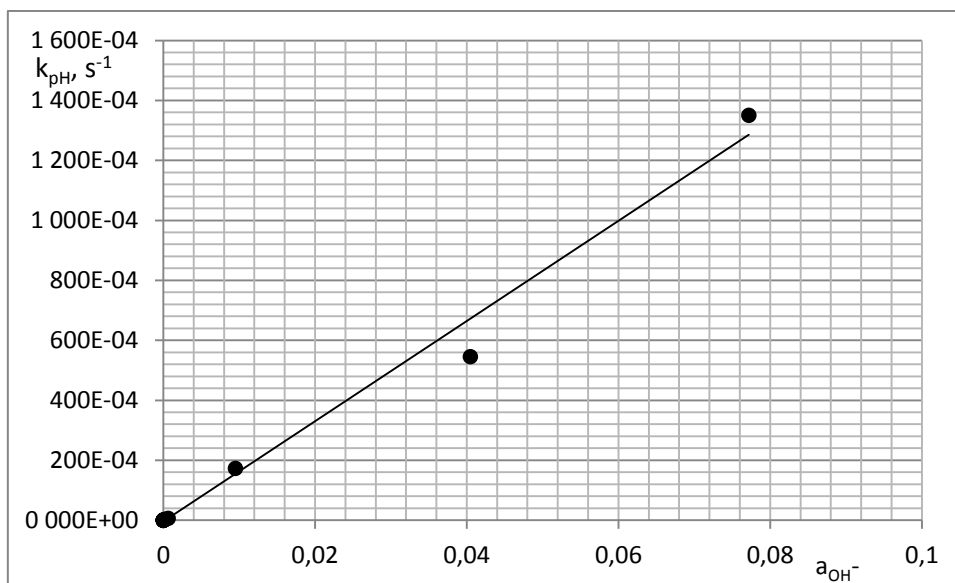
Wartości  $f_1$ - $f_3$  wyznaczono uwzględniając wartości  $pK_a$  ceftiofuru sodowego odpowiednio: 1,70 i 2,62 (323 K) [100]. Ułamki stężeń poszczególnych form ceftiofuru sodowego jako funkcję pH przedstawiono na rycinie 41.





Rycina 41. Ułamki stężeń poszczególnych form jonowych ceftiofuru sodowego w temperaturze 323 K.

Katalityczną stałą szybkości reakcji  $k_{OH^-}$  obliczono z zależności  $k_{pH} = f(a_{OH^-})$ , uwzględniając wartości  $k_{pH}$  z zakresu pH powyżej 5, w którym  $f_3 \rightarrow 1$ . Wykres  $k_{pH} = f(a_{OH^-})$  jest prostoliniowy o nachyleniu dodatnim, równym  $k_{OH^-}$  ( $k_{OH^-} = 1,67 \pm 0,11 \text{ mol}^{-1} \text{ l s}^{-1}$ ) (Rycina 42).

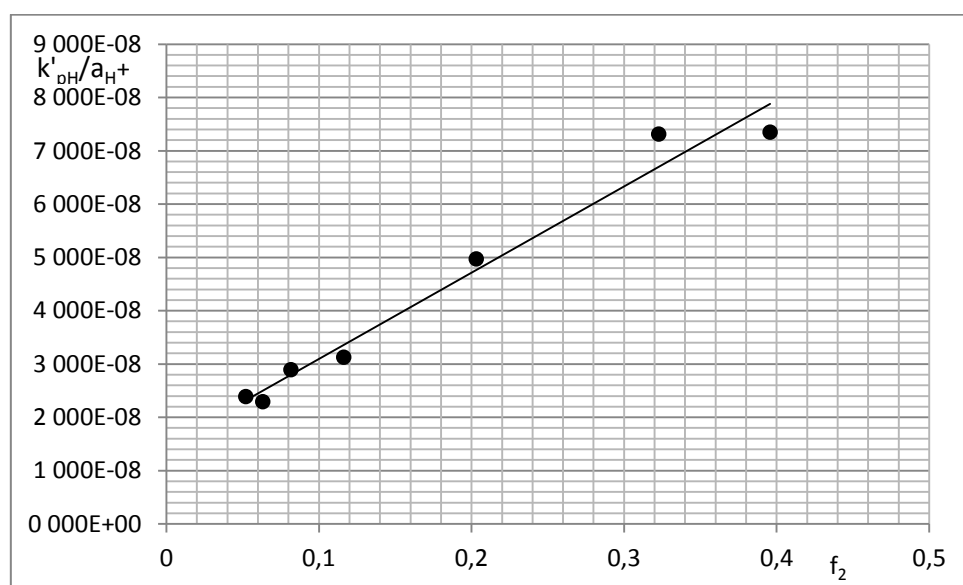


Rycina 42. Wykres zależności  $k_{pH} = f(a_{OH^-})$  reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w roztworach wodnych, w temperaturze 323 K.

W zakresie pH 0,44 – 1,54,  $f_1 + f_2 \rightarrow 1$ , zatem

$$k_{pH} = k_{H^+} a_{H^+} f_1 + k'_{H^+} a_{H^+} f_2$$

Wykres  $k_{pH}/a_{H^+} = f(f_2)$  jest prostoliniowy (Rycina 43). Wyznaczona wartość  $k_{pH}/a_{H^+}$  dla  $f_2 = 1$  odpowiada katalitycznej stałej szybkości hydrolizy monokationu CFT katalizowanej jonami wodorowymi  $k_{H^+}$  ( $k_{H^+} = 1,48 \cdot 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ l s}^{-1}$ ), natomiast dla  $f_2 = 0$  katalitycznej stałej szybkości hydrolizy jonów obojnych CFT katalizowanej jonami wodorowymi  $k'_{H^+}$  ( $k'_{H^+} = 1,77 \cdot 10^{-4} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ).



Rycina 43. Wykres zależności  $k_{pH}/a_{H^+} = f(f_2)$  reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w roztworach wodnych, w temperaturze 323 K.

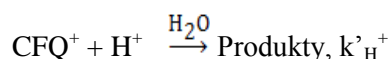
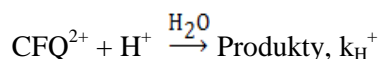
Wartość  $k_{H_2O}$  ( $k_{H_2O} = 2,02 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ) została wyznaczona z zakresu pH 3,65–6,78, jako wartość średnia z zależności

$$k'_{pH} = k_{pH} - (k_{H^+} a_{H^+} f_1 + k'_{H^+} a_{H^+} f_2 + k_{OH^-} a_{OH^-} f_3) = k_{H_2O} f_3$$

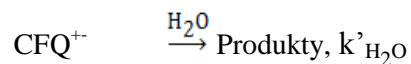
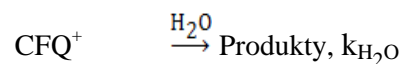
#### Siarczan cefkwinomu (CFQ)

Wykres zależności  $\log k_{pH} = f(\text{pH})$  siarczanu cefkwinomu (Rycina 44) wskazuje, że w roztworach wodnych, przy zerowym stężeniu składników buforów, możliwe są następujące reakcje:

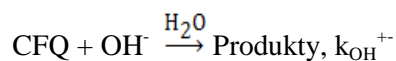
- hydroliza di- i monokationu CFQ katalizowana jonami wodorowymi ( $k_{H^+}$  i  $k'_{H^+}$ )



- spontaniczna hydroliza monokationów i jonów obojnaczych CFQ pod wpływem wody ( $k_{H_2O}$  i  $k'_{H_2O}$ )

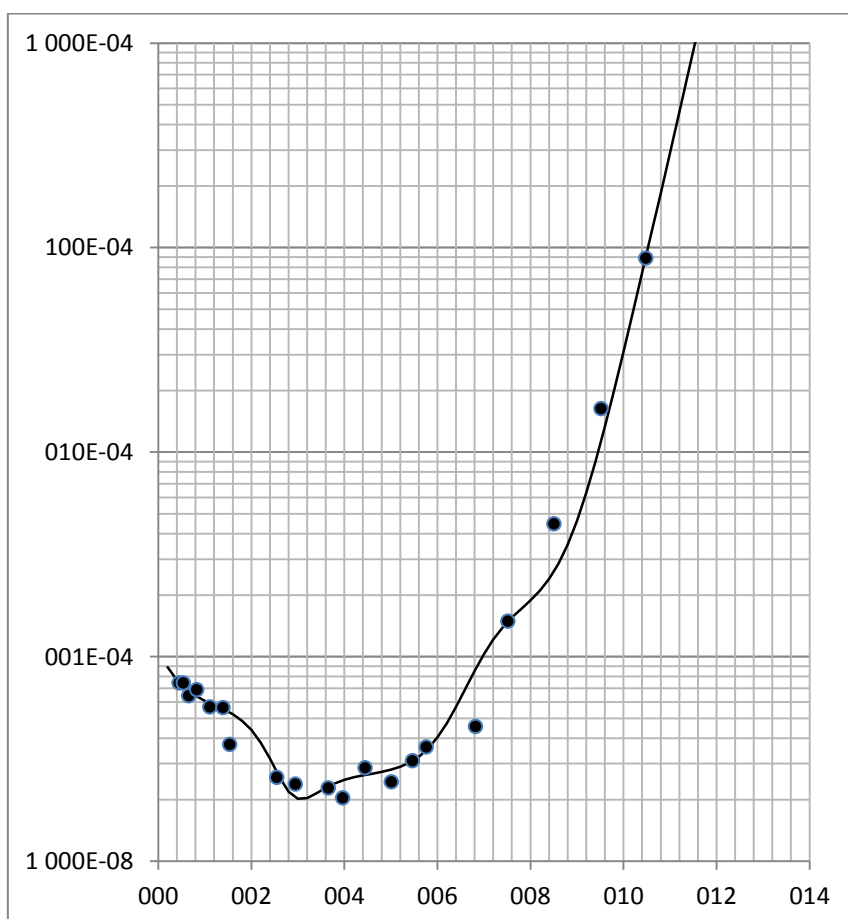


- hydroliza cząsteczek CFQ katalizowana jonami wodorotlenowymi ( $k_{OH^-}$ )



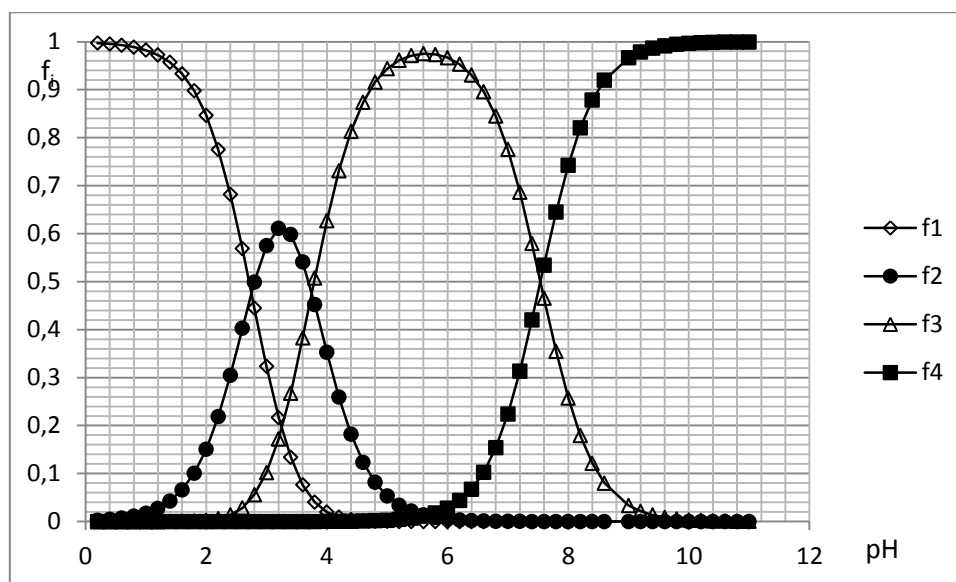
Całkowita szybkość reakcji jest równa sumie cząstkowych stałych szybkości powyższych reakcji:

$$k_{pH} = k_{H^+} a_{H^+} f_1 + k'_{H^+} a_{H^+} f_2 + k_{H_2O} f_3 + k'_{H_2O} f_4 + k_{OH^-} a_{OH^-}$$



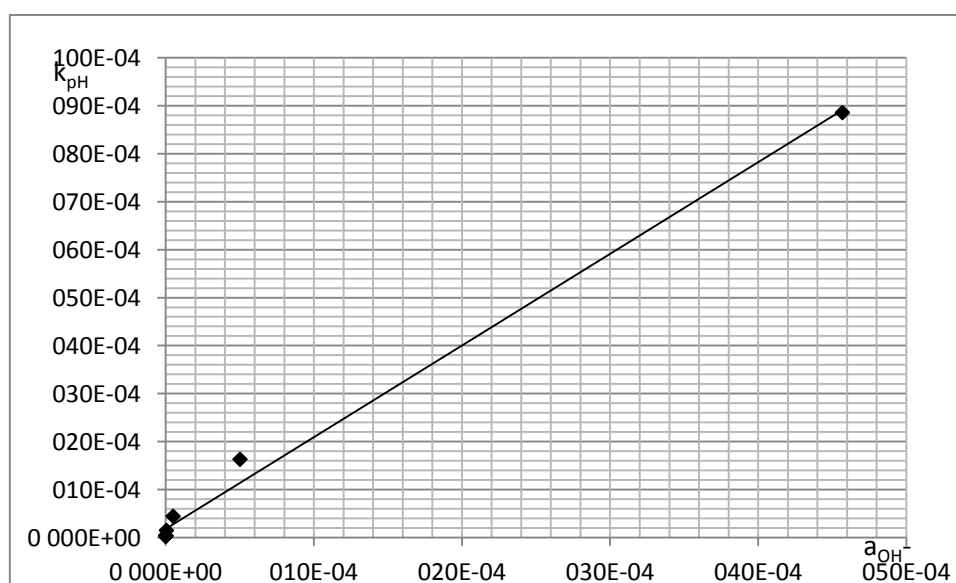
Rycina 44. Półlogarytmiczna zależność  $k_{pH} = f(pH)$  reakcji rozkładu siarczanu cefkwimomu w roztworach wodnych, w temperaturze 343 K. Punkторы – wartości doświadczalne, linia ciągła – profil teoretyczny.

W obliczeniach uwzględniono wyznaczone wartości  $pK_a$  wynoszące odpowiednio: 2,75, 3,75 i 7,54. Na rycinie 45 przedstawiono ułamki stężeń poszczególnych form CFQ jako funkcję pH.



Rycina 45. Ułamki stężeń poszczególnych form jonowych siarczanu cefkwinoemu w temperaturze 343 K.

Katalityczną stałą szybkości reakcji  $k_{OH^-}$  obliczono z zależności  $k_{pH} = f(a_{OH^-})$ , uwzględniając wartości  $k_{pH}$  z zakresu pH powyżej 6. Wykres  $k_{pH} = f(a_{OH^-})$  jest prostoliniowy o nachyleniu dodatnim, równym  $k_{OH^-}$  ( $k_{OH^-} = 1,91 \pm 0,14 \text{ mol}^{-1} \text{ l s}^{-1}$ ) (Rycina 46).



Rycina 46. Wykres zależności  $k_{pH} = f(a_{OH^-})$  reakcji rozkładu siarczanu cefkwinoemu w roztworach wodnych, w temperaturze 343 K.

W zakresie pH powyżej 6,  $f_3 + f_4 \rightarrow 1$ , zatem

$$k_{\text{pH}} = k_{\text{H}_2\text{O}} f_3 + k'_{\text{H}_2\text{O}} f_4 + k_{\text{OH}^-} a_{\text{OH}^-}$$

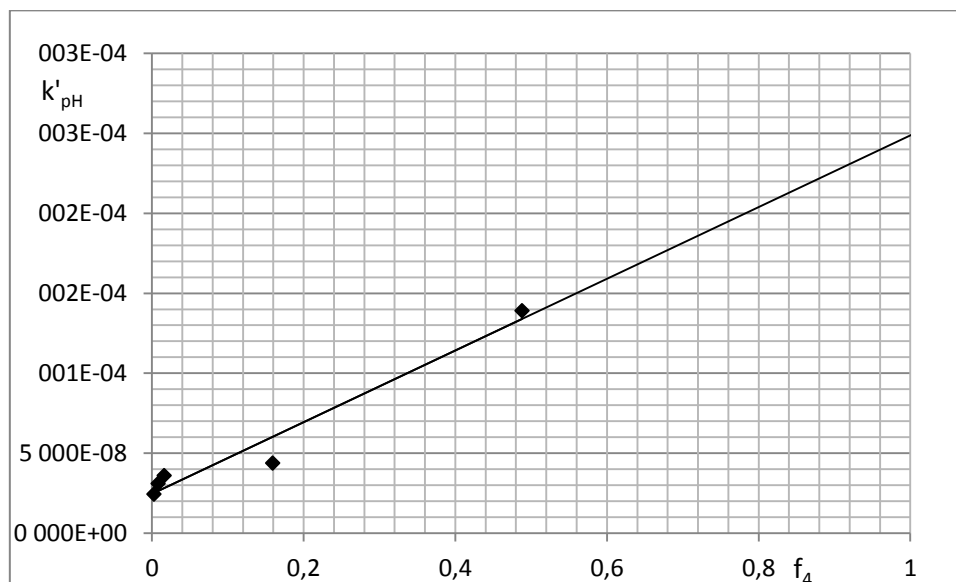
Wartość  $k_{\text{OH}^-}$  została wyznaczona z zależności  $k_{\text{pH}} = f(a_{\text{OH}^-})$ , zatem

$$k'_{\text{pH}} = k_{\text{pH}} - (k_{\text{OH}^-} a_{\text{OH}^-}) = k_{\text{H}_2\text{O}} f_3 + k'_{\text{H}_2\text{O}} f_4$$

Wykonano wykres  $k'_{\text{pH}} = f(f_4)$ , uwzględniając wartości  $k'_{\text{pH}}$  w zakresie pH powyżej 6.

Wykres ten jest prostoliniowy (Rycina 47), a odcinek rzędnej dla  $f_4 = 1$  odpowiada stałej  $k'_{\text{H}_2\text{O}}$  ( $k'_{\text{H}_2\text{O}} = 2,24 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ), natomiast stałą szybkości spontanicznej hydrolizy pod wpływem wody monokationów CFQ obliczono jako wartość średnią z zależności:

$$k_{\text{H}_2\text{O}} = k_{\text{pH}} - (k_{\text{OH}^-} a_{\text{OH}^-} + k'_{\text{H}_2\text{O}} f_4) = 3,10 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$$



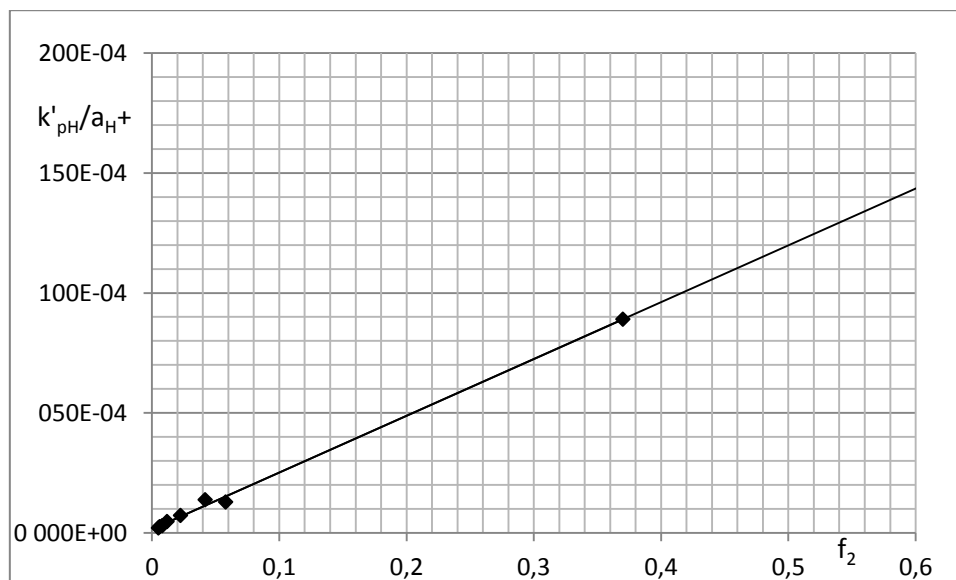
Rycina 47. Wykres  $k'_{\text{pH}} = f(f_4)$  reakcji rozkładu siarczanu cefkwinu w roztworach wodnych, w temperaturze 343 K.

W zakresie pH do ok. 6

$$k'_{\text{pH}} = k_{\text{pH}} - (k_{\text{OH}^-} a_{\text{OH}^-} + k_{\text{H}_2\text{O}} f_3 + k'_{\text{H}_2\text{O}} f_4) = k_{\text{H}^+} a_{\text{H}^+} f_1 + k'_{\text{H}^+} a_{\text{H}^+} f_2$$

Wykres  $k'_{\text{pH}}/a_{\text{H}^+} = f(f_2)$  jest prostoliniowy (Rycina 48), odcinek rzędnej dla  $f_2 = 1$  odpowiada katalitycznej stałej szybkości rozkładu kationów CFQ katalizowanej jonami wodorowymi ( $k'_{\text{H}^+} = 2,37 \cdot 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ l s}^{-1}$ ), natomiast wartość  $k'_{\text{pH}}$  dla  $f_2 = 0$  odpowiada katalitycznej

szybkości reakcji rozkładu dikationów CFQ katalizowanej jonami wodorowymi ( $k_{H^+} = 1,44 \cdot 10^{-4} \text{ mol}^{-1} \text{ l s}^{-1}$ ).



Rycina 48. Wykres  $k'_{pH}/a_{H^+} = f(f_2)$  reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomu w roztworach wodnych, w temperaturze 343 K.

Wyznaczone katalityczne stałe szybkości poszczególnych reakcji cząstkowych ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu wykorzystano do obliczenia profili  $\log k_{pH} = f(\text{pH})$ . Obliczone profile przedstawiono na rycinach 40 i 44 linią ciągłą, natomiast wartości  $k_{pH}$  wyznaczone doświadczalnie zaznaczono punktorem. Uzyskana zgodność profili obliczonych z profilami doświadczalnymi, potwierdza, że zastosowano prawidłowe równania opisujące właściwą katalizę kwasowo-zasadową dla obu badanych związków.

Podsumowując badania ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w roztworach wodnych, można stwierdzić, że:

- rozkład obu związków zachodzi zgodnie z kinetyką reakcji pseudopierwszego rzędu
- w reakcji rozkładu obu związków ma miejsce ogólna i właściwa kataliza kwasowo-zasadowa
- efekt katalityczny wykazują składniki buforu fosforanowego kwasowego (ceftiofuru sodowy i siarczan cefkwinomu) oraz składniki buforu octanowego i boranowego (siarczan cefkwinomu)

- ceftiofur sodowy jest najbardziej trwały w warunkach właściwej katalizy kwasowo-zasadowej w roztworach o pH od ok. 2 do ok.7, natomiast siarczan cefkwinomu w roztworach o pH od ok. 3 do ok. 5,5.

#### *Trwałość ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach do iniekcji*

Badania trwałości ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu przeprowadzono w 11 roztworach do podania parenteralnego (Tabela 6). Badania prowadzono w temperaturze pokojowej (293 K), 2-8<sup>0</sup>C (~279 K) oraz -20<sup>0</sup>C (253 K). Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach 30 – 33. W przeprowadzonych badaniach trwałości w wybranych roztworach do podania parenteralnego jako trwałe uznawano roztwory, w których ubytek stężenia substratu nie przekraczał 10% wartości początkowej. W przypadku stwierdzenia zmian w wyglądzie roztworu, badanie przerywano.

Stwierdzono, że ceftiofur sodowy w roztworach do podania parenteralnego, przechowywany w temperaturze pokojowej jest najbardziej trwały w wodzie do iniekcji oraz w roztworze Ringera. W roztworach tych po 23 dniach badania stwierdzano 91,92% i 92,60% ceftiofuru sodowego w odniesieniu do wartości początkowej 100%. W płynie fizjologicznym wieloelektrolitowym izotonicznym, płynie pediatrycznym wyrównawczym, w 0,9% roztworze chlorku sodu, 5% roztworze glukozy i mieszaninie 5% roztworu glukozy i 0,9% roztworu chlorku sodu (1:1) badanie w temperaturze pokojowej przerwano po 2 dniach, z uwagi na zmętnienie roztworu. W pozostałych badanych roztworach przechowywanych w temperaturze pokojowej, ceftiofur sodowy zachowuje odpowiednią trwałość do 6 dni.

W temperaturze 279 K ceftiofur sodowy wykazywał odpowiednią trwałość podczas 28 dni badania we wszystkich roztworach, przy czym najmniejszy ubytek substratu obserwowano w płynie pediatrycznym wyrównawczym i 0,9% roztworze chlorku sodu.

W przypadku siarczanu cefkwinomu, w temperaturze pokojowej badania prowadzono 6 dni i stwierdzono, że badany związek jest najbardziej trwały w 0,9% roztworze chlorku sodu (99,84% po 6 dniach badania) oraz najmniej trwały w 10% roztworze glukozy (75,34% po 6 dniach badania). Siarczan cefkwinomu po 6 dniach przechowywania można uznać za trwały w wodzie do iniekcji (91,93%), w płynie fizjologicznym wieloelektrolitowym izotonicznym (92,13%) oraz w mieszaninie 5% roztworu glukozy i 0,9% roztworu chlorku

sodu (91,01%). W temperaturze 279 K siarczan cefkwinomu zachowywał odpowiednią trwałość do 9 dni we wszystkich badanych roztworach.

Roztwory ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w roztworach parenteralnych, przechowywane w temperaturze 253 K były trwałe, po 30 dniach przechowywania nie stwierdzono ubytku zawartości badanych cefalosporyn powyżej 10%. Badane cefalosporyny w płynie pediatrycznym wyrównawczym nie ulegały rozkładowi i po 30 dniach badania ich stężenie nie różniło się istotnie od stężenia początkowego [101].

#### *Trwałość ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w fazie stałej*

Badania wpływu temperatury przy wilgotności względnej powietrza 0%, prowadzono w temperaturze 353 K, 363 K, 373 K i 383 K (ceftiofur sodowy) lub w temperaturze 363 K, 373 K, 383 K i 393 K (siarczan cefkwinomu). Badania wpływu temperatury przy podwyższonej wilgotności względnej powietrza (76,4%) prowadzono w temperaturze 333 K, 343 K, 353 K i 363 K. Wpływ wilgotności względnej powietrza określono w temperaturze 363 K (ceftiofur sodowy) lub 343 K (siarczan cefkwinomu), w zakresie wilgotności względnej powietrza od 66,5% do 90,0%.

Rozkład ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w fazie stałej zachodzi zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu. W czasie od  $t_0$  do  $t_\infty$ , wartości  $P_i$  substratu malały do zera.

Dla prostoliniowych wykresów  $\ln P_t = f(t)$  obliczono metodą najmniejszych kwadratów parametry równania  $y = ax + b$ . Wyznaczone stałe szybkości rozkładu posłużyły do wyznaczenia zależności Arrheniusa w atmosferze powietrza o wilgotności względnej powietrza 0% i 76,4%.

Poniżej przedstawiono zlogarytmowaną postać równania Arrheniusa:

$$\ln k_i = \ln A - a/T$$

gdzie:

$k_i$  – stała szybkości reakcji [ $s^{-1}$ ],

$A$  – współczynnik częstotliwości [ $s^{-1}$ ],

$T$  – temperatura bezwzględna [K],

$a$  – nachylenie wykresu  $\ln k_i = f(1/T)$ , ma wartość ujemną  $-a = E_a/R$

$R$  – uniwersalna stała gazowa ( $8,3144 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

Wykonano półlogarytmiczne wykresy  $\ln k_i = f(1/T)$  (Rycina 49 – 52). Po uwzględnieniu obliczonych metodą najmniejszych kwadratów parametrów krzywej  $\ln k_i = f(1/T)$ ,



wyznaczono parametry termodynamiczne reakcji: energię aktywacji ( $E_a$ ), entalpię ( $\Delta H^\ddagger$ ) i entropię ( $\Delta S^\ddagger$ ) dla temperatury 298 K

$$E_a = -a \cdot R \text{ [J} \cdot \text{mol}^{-1}\text{]}$$

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT \text{ [J} \cdot \text{mol}^{-1}\text{]}$$

$$\Delta S^\ddagger = R \cdot [\ln A - \ln (k_B \cdot T/h)] \text{ [J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}\text{]}$$

gdzie:

$k_B$  – stała Boltzmanna ( $1,380658 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ )

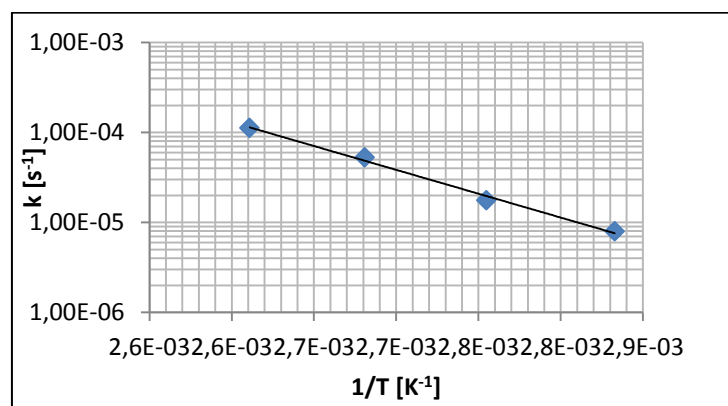
$h$  – stała Plancka ( $6,626068 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}^{-1}$ )

$\Delta H^\ddagger$  i  $\Delta S^\ddagger$  obliczono dla temperatury 293 K.

Obliczone parametry termodynamiczne reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinu przy wilgotności względnej powietrza 76,4% i 0% przedstawiono w tabelach 40 – 43.

Tabela 40. Parametry prostej  $\ln k_i = f(1/T)$  i parametry termodynamiczne reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w fazie stałej, przy wilgotności względnej powietrza 76,4%

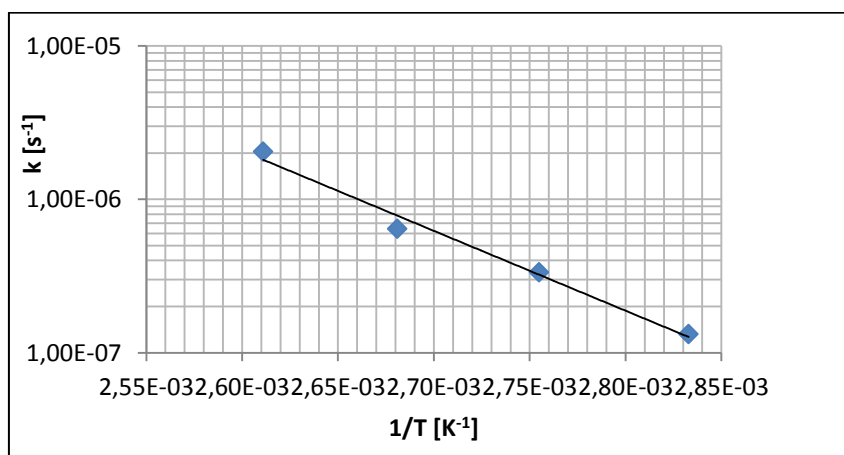
T [K]	$1/T \cdot 10^3$	$k \pm \Delta k, \text{ s}^{-1}$	Parametry równania $\ln k_i = f(1/T)$	Parametry termodynamiczne
363	2,75	$(1,12 \pm 0,22) 10^{-4}$	$a \pm \Delta a = (-10,9 \pm 0,2) 10^3$ $S_a = 563,2$ $b \pm \Delta b = 21,0 \pm 7,0; S_b = 1,6$ $r = -0,9973; S_y = 0,1$ $n = 4$	$E_a = 90,7 \pm 20,1 \text{ [kJ} \cdot \text{mol}^{-1}\text{]}$ $\Delta H^\ddagger = 88,3 \pm 20,1 \text{ [kJ} \cdot \text{mol}^{-1}\text{]}$ $\Delta S^\ddagger = -70,3 \pm 57,9 \text{ [J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}\text{]}$
353	2,83	$(5,26 \pm 0,30) 10^{-5}$		
343	2,92	$(1,76 \pm 0,36) 10^{-5}$		
333	3,00	$(7,95 \pm 0,32) 10^{-6}$		



Rycina 49. Zależność Arrheniusa dla reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w atmosferze powietrza o wilgotności względnej 76,4%.

Tabela 41. Parametry prostej  $\ln k_i = f(1/T)$  i parametry termodynamiczne reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w fazie stałej, przy wilgotności względnej powietrza 0%

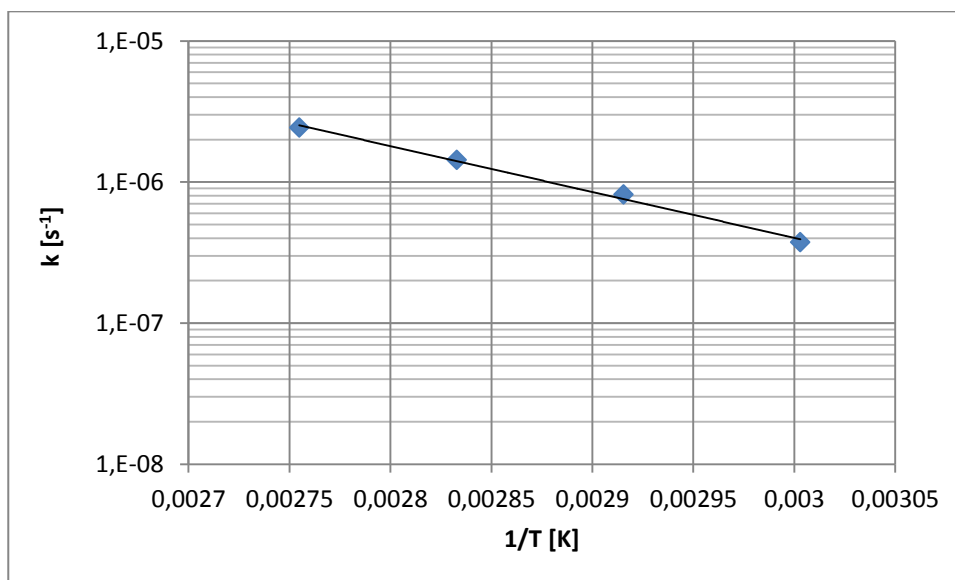
T [K]	$1/T \cdot 10^3$	$k \pm \Delta k, s^{-1}$	Parametry równania $\ln k_i = f(1/T)$	Parametry termodynamiczne
383	2,61	$(2,05 \pm 0,28) 10^{-6}$	$a \pm \Delta a = (-12,0 \pm 0,4) \cdot 10^3$ $S_a = 1023,9$ $b \pm \Delta b = 18,0 \pm 12,0; S_b = 2,8$ $r = -0,9927; S_y = 0,2$ $n = 4$	$E_a = 99,4 \pm 36,6 [kJ \cdot mol^{-1}]$ $\Delta H^\ddagger = 97,0 \pm 36,7 [kJ \cdot mol^{-1}]$ $\Delta S^\ddagger = -95,1 \pm 99,7 [J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}]$
373	2,68	$(6,43 \pm 0,96) 10^{-7}$		
363	2,75	$(3,34 \pm 0,77) 10^{-7}$		
353	2,83	$(1,33 \pm 0,37) 10^{-7}$		



Rycina 50. Zależność Arrheniusa dla reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego przy wilgotności względnej powietrza 0%.

Tabela 42. Parametry prostej  $\ln k_i = f(1/T)$  i parametry termodynamiczne reakcji rozkładu siarczanu cefkwynomu w fazie stałej, w warunkach stałej wilgotności względnej powietrza 76,4%

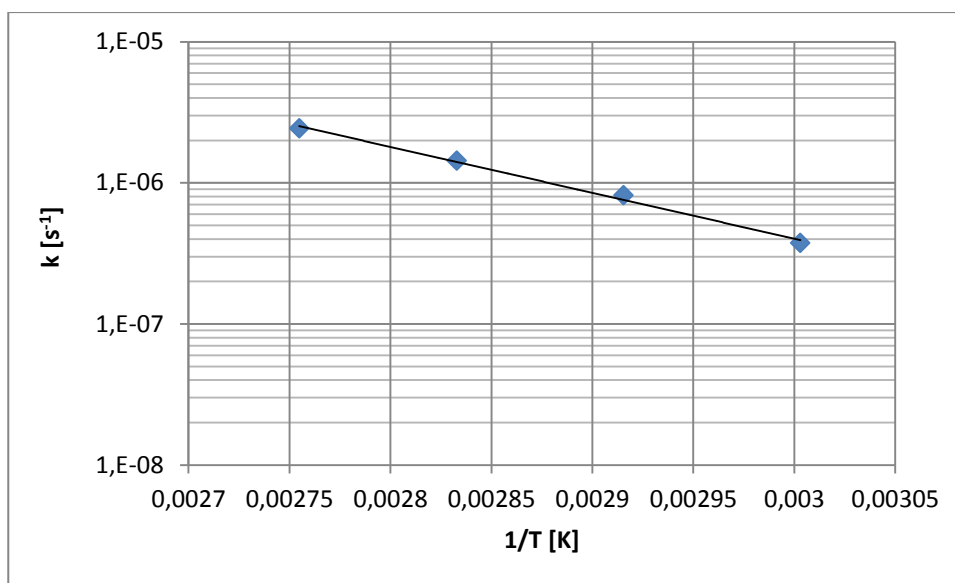
T [K]	$1/T \cdot 10^3$	$k \pm \Delta k, s^{-1}$	Parametry równania $\ln k_i = f(1/T)$	Parametry termodynamiczne
363	2,75	$(2,43 \pm 0,10) 10^{-6}$	$a \pm \Delta a = (-7,5 \pm 1,0) \cdot 10^3$ ; $S_a = 3,8 \cdot 10^2$ $b \pm \Delta b = 7,7 \pm 3,0$ ; $S_b = 1,1$ $r = -0,9975$ ; $S_y = 0,1$ $n = 4$	$E_a = 62,3 \pm 13,4 [kJ \cdot mol^{-1}]$ $\Delta H^\ddagger = 59,8 \pm 15,9 [kJ \cdot mol^{-1}]$ $\Delta S^\ddagger = -180,4 \pm 38,6 [J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}]$
353	2,83	$(1,43 \pm 0,17) 10^{-6}$		
343	2,92	$(8,14 \pm 0,72) 10^{-7}$		
333	3,00	$(3,73 \pm 0,36) 10^{-7}$		



Rycina 51. Zależność Arrheniusa dla reakcji rozkładu siarczanu cefkwynomu w atmosferze powietrza o wilgotności względnej 76,4%.

Tabela 43. Parametry termodynamiczne i parametry prostej  $\ln k_i = f(1/T)$  reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomowy w fazie stałej, przy wilgotności względnej powietrza 0%

T [K]	$1/T \cdot 10^3$	$k \pm \Delta k, s^{-1}$	Parametry równania $\ln k_i = f(1/T)$	Parametry termodynamiczne
393	2,54	$(2,91 \pm 0,46) \cdot 10^{-6}$	$a \pm \Delta a = (-1,6 \pm 0,5) \cdot 10^4$ $S_a = 1,9 \cdot 10^3$ $b \pm \Delta b = 28,2 \pm 14,0; S_b = 5,0$ $r = -0,9861; S_y = 0,3$ $n = 4$	$E_a = 133,1 \pm 68,2 [kJ \cdot mol^{-1}]$ $\Delta H^\ddagger = 130,6 \pm 70,6 [kJ \cdot mol^{-1}]$ $\Delta S^\ddagger = -10,5 \pm 180,5 [J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}]$
383	2,61	$(1,48 \pm 0,14) \cdot 10^{-6}$		
373	2,68	$(5,13 \pm 0,39) \cdot 10^{-7}$		
363	2,75	$(1,00 \pm 0,32) \cdot 10^{-7}$		



Rycina 52. Zależność Arrheniusa dla reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomowy w fazie stałej, przy wilgotności względnej powietrza 0%.

Najniższą energię aktywacji wykazuje reakcja rozkładu siarczanu cefkwinomu w obecności wilgotności względnej powietrza 76,4%, natomiast najwyższą reakcja rozkładu tego związku przy wilgotności względnej powietrza 0%.

Energia aktywacji reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego przy  $RH = 0\%$  i  $RH = 76,4\%$  nie różni się istotnie ( $E_{a, RH = 0\%} = 99,4 \text{ [kJ} \cdot \text{mol}^{-1}]$ ,  $E_{a, RH = 76,4\%} = 90,7 \text{ [kJ} \cdot \text{mol}^{-1}]$ ), co potwierdzono testem równoległości:  $t_{obl} = 1,33 < t_{0,05} = 2,78$ .

W przypadku siarczanu cefkwinomu stwierdzono, że warunki przechowywania mają istotny wpływ na jego trwałość, gdyż wartości nachylenia wykresów  $\ln k_i = f(1/T)$  dla  $RH = 0\%$  i  $RH = 76,4\%$  różnią się istotnie:  $t_{obl} = 4,12 > t_{0,05} = 2,78$ .

Nie stwierdzono istotnych różnic we wpływie temperatury na szybkość rozkładu badanych cefalosporyn w atmosferze powietrza 0%:  $t_{obl} = 1,63 < t_{0,05} = 2,78$ , natomiast wpływ taki był obserwowany przy wilgotności względnej powietrza 76,4%:  $t_{obl} = 5,19 > t_{0,05} = 2,78$ .

Dla obu związków w warunkach badania w fazie stałej obserwuje się ujemne entropie aktywacji. Entropia aktywacji, czyli różnica stanu przejściowego danej reakcji oraz jej stanu początkowego nie zależy od początkowej energii aktywacji. Jeżeli w stanie przejściowym możliwość ruchów jest ograniczona lub zahamowana, wówczas  $\Delta S^\ddagger$  maleje i przyjmuje bardziej ujemne wartości, im silniej jest ograniczona swoboda ruchów reagentów w kompleksie aktywnym. Ujemne entropie aktywacji są charakterystyczne dla reakcji dwucząsteczkowych, podczas których dwie cząsteczki łączą się w jeden kompleks aktywny.

*Wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu*

Wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu określono z zależności  $\ln k_i = a (\text{RH} \%) + b$ . Wartość nachylenia  $a$  wykresu  $\ln k_i = f(\text{RH}, \%)$  określa wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość badanych związków (Tabela 44 – 45; Rycina 53 – 54).

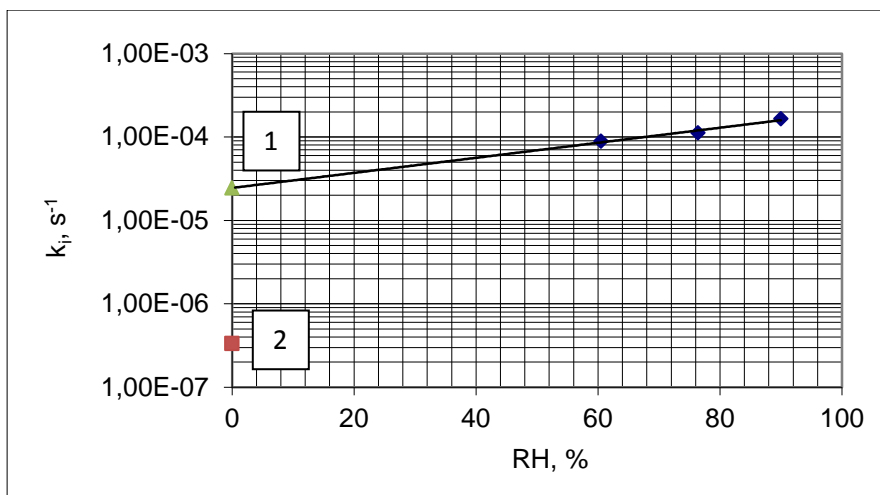
Tabela 44. Ocena statystyczna prostej  $\ln k_i = f(\text{RH}\%)$  reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w fazie stałej, w temperaturze 363 K

Lp.	RH [%]	$k$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	Ocena statystyczna prostej $\ln k_i = f(\text{RH}\%)$
1	90,0	$1,65 \times 10^{-4}$	$a \pm \Delta a = 0,0264 \pm 0,0062$ $S_a = 0,0014$ $b \pm \Delta b = -11,09 \pm 0,48$ $S_b = 0,1126$ $r = -0,9985; S_y = 0,024$ $n = 3$
2	76,4	$1,12 \times 10^{-4}$	
3	66,5	$8,89 \times 10^{-5}$	

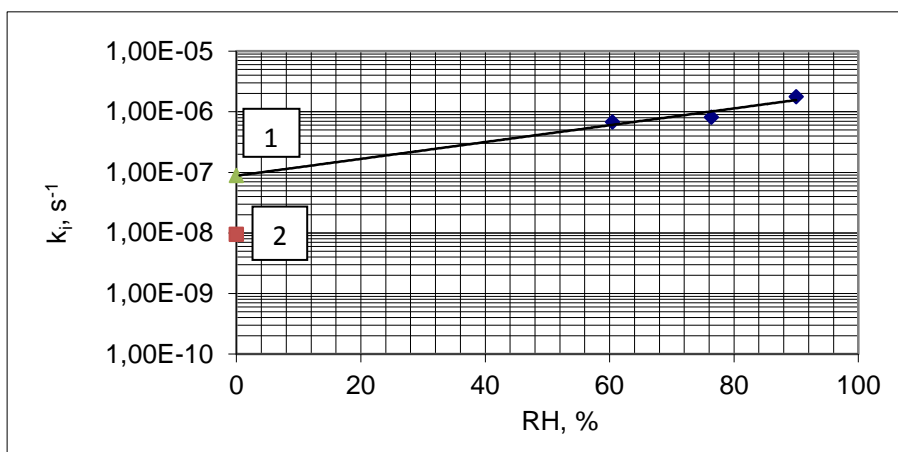
Tabela 45. Ocena statystyczna prostej  $\ln k_i = f(\text{RH}\%)$  reakcji rozkładu siarczanu cefkwinomu w fazie stałej, w temperaturze 343 K

Lp.	RH [%]	$k$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	Ocena statystyczna prostej $\ln k_i = f(\text{RH}\%)$
1	90,0	$1,76 \times 10^{-6}$	$a \pm \Delta a = -0,0604 \pm 0,4671$ $S_a = 0,0367$ $b \pm \Delta b =$ $S_b = 2,8760$ $r = -0,8545; S_y = 0,6134$ $n = 3$
2	76,4	$8,14 \times 10^{-7}$	
3	66,5	$6,74 \times 10^{-7}$	

Z równania Arrheniusa wyznaczono wartość stałej szybkości reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w temperaturze 363 K w atmosferze powietrza o wilgotności względnej 0%, natomiast w przypadku siarczanu cefkwinomu w temperaturze 343 K. Ekstrapolowaną wartość  $\ln k_{T=363 \text{ K}, \text{RH}=0\%}$  porównano z wartością  $k_0$  stałej szybkości reakcji CFT w temperaturze 363 K, przy RH 0%, natomiast CFQ  $\ln k_{T=343 \text{ K}, \text{RH}=0\%}$  w temperaturze 343 K przy RH = 0% (Rycina 53 – 54).



Ryc. 53. Półlogarytmiczna zależność  $k_i = f(RH\%)$  reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w fazie stałej, w temperaturze 363 K, 1 – wartość  $k_0$  dla RH = 0% w temperaturze 363 K, 2 – wartość  $k_{363, RH=0\%}$  obliczonego z zależności  $\ln k_i = f(1/T)$ .



Ryc. 54. Półlogarytmiczna zależność  $k_i = f(RH\%)$  reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego w fazie stałej, w temperaturze 343 K, 1 – wartość  $k_0$  dla RH = 0% w temperaturze 343 K, 2 – wartość  $k_{343, RH=0\%}$  obliczonego z zależności  $\ln k_i = f(1/T)$

Wyznaczone z zależności  $\ln k_i = f(RH\%)$  wartości:

$k_0 = 2,45 \cdot 10^{-5} s^{-1}$ , dla ceftiofuru sodowego w temperaturze 363 K

$k_0 = 8,81 \cdot 10^{-8} s^{-1}$ , dla siarczanu cefkwinomu w temperaturze 343 K

i wyznaczone z zależności  $\ln k_i = f(1/T)$  wartości:

$k_{363 K, RH=0\%} = 3,34 \cdot 10^{-7} s^{-1}$  dla ceftiofuru sodowego oraz

$k_{343 K, RH=0\%} = 9,46 \cdot 10^{-9} s^{-1}$  dla siarczanu cefkwinomu,

różnią się istotnie i potwierdzają odmienny mechanizm reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w atmosferze powietrza o wilgotności względnej 0% oraz w atmosferze powietrza o podwyższonej wilgotności względnej, mimo iż kinetyczny

mechanizm rozkładu obu związków jest taki sam (reakcje pierwszego rzędu względem stężenia substratu).

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań można określić optymalne warunki przechowywania preparatów ceftiofuru sodowego oraz siarczanu cefkwinomu, pozwalające zachować pełną skuteczność, trwałość oraz bezpieczeństwo stosowania do końca okresu ich ważności.



## 6. WNIOSKI

---

1. Rozkład ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w warunkach hydrolizy oraz w roztworach do podania parenteralnego zachodzi zgodnie z kinetyką reakcji pseudopierwszego rzędu względem stężenia substratu.
2. W reakcji rozkładu ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w roztworach wodnych występuje ogólna i właściwa kataliza kwasowo-zasadowa, na którą składają się: hydroliza katalizowana jonami wodorowymi i wodorotlenowymi oraz hydroliza spontaniczna pod wpływem wody, zależne od ładunku substratu. Ceftiofur sodowy jest najbardziej trwały w zakresie pH od ok. 2 do ok. 7, natomiast siarczan cefkwinomu w zakresie pH od ok. 3 do ok. 5,5.
3. Ceftiofur sodowy w powszechnie stosowanych roztworach do podania parenteralnego przechowywanych w temperaturze pokojowej był najbardziej trwały w wodzie do iniekcji oraz w roztworze Ringera, natomiast siarczan cefkwinomu w 0,9% roztworze chlorku sodu.
4. Kinetyczny mechanizm rozkładu ceftiofuru sodowego i siarczanu cefkwinomu w fazie stałej nie zależy od warunków przechowywania i zachodzi zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu w obecności podwyższonej wilgotności względnej powietrza oraz przy  $RH = 0\%$ .



## 7. STRESZCZENIE

---

Celem badań była ocena trwałości ceftiofuru sodowego (CFT) i siarczanu cefkwinomu (CFQ) w roztworach wodnych, w warunkach ogólnej właściwej katalizy kwasowo-zasadowej, w roztworach do podania parenteralnego oraz w fazie stałej. Do oceny zmian stężenia badanych cefalosporyn zastosowano metodę HPLC z detekcją UV.

W metodzie HPLC zastosowano podane poniżej parametry rozdzielania, które umożliwiły ocenę zmian stężenia substratu w obecności produktów rozkładu:

- kolumna:
  - ceftiofur sodowy: LiChroCart (5  $\mu$ m) 250  $\times$  4,6 mm, Merck Darmstadt, Niemcy
  - siarczan cefkwinomu: LiChroCart (5  $\mu$ m) 125  $\times$  4,6 mm, Merck Darmstadt, Niemcy
- faza ruchoma:
  - ceftiofur sodowy: 0,02 mol/l bufor fosforanowy (pH 6,0) – acetonitryl (78:22 V/V)
  - siarczan cefkwinomu: 0,02 mol/l bufor fosforanowy (pH 7,0) – acetonitryl (90:10 V/V)
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,0 ml/min
- detektor: spektrofotometr UV,  $\lambda = 292$  nm (CFT) lub 268 nm (CFQ)
- temperatura kolumny: 303 K

Metodę HPLC poddano walidacji, określając selektywność, liniowość, precyzję, granicę wykrywalności i granicę oznaczalności.

Badania kinetyczne reakcji rozkładu CFT i CFQ w roztworach wodnych wykonano w zakresie pH od 0,44 do 13,57 w temperaturze 323 K (ceftiofur sodowy) lub 343 K (siarczan cefkwinomu). Rozkład CFT i CFQ w roztworach wodnych zachodził zgodnie z modelem reakcji pseudopierwszego rzędu względem stężenia substratu i opisany był następującym równaniem:

$$\ln c_t = \ln c_0 - k_{\text{obs}} \cdot t$$

Stwierdzono, że efekt katalityczny wykazują składniki buforu fosforanowego (pH 1,54 – 2,95) (CFT i CFQ) oraz składniki buforu octanowego (pH 3,66 – 5,47) i boranowego (pH 7,52 – 10,48) (CFQ).

W pozostałych roztworach obserwowano właściwą katalizę kwasowo-zasadową.

Na właściwą katalizę kwasowo-zasadową reakcji rozkładu CFT i CFQ składają się reakcje katalizowane jonami wodorowymi i wodorotlenowymi oraz hydroliza spontaniczna pod wpływem wody. Wszystkie reakcje zależą od ładunku substratu. Z odpowiednich równań wyznaczono katalityczne stałe szybkości poszczególnych reakcji cząstkowych.

W warunkach właściwej katalizy kwasowo-zasadowej, CFT wykazuje największą trwałość w zakresie pH od ok. 2 do ok. 7, natomiast CFQ w zakresie pH od ok. 3 do ok. 5,5.

W badaniach trwałości CFT i CFQ w powszechnie stosowanych roztworach do podania parenteralnego, określono ich zawartość w 11 roztworach, przechowywanych w temperaturze pokojowej (293 K), w temperaturze 2–8°C (~279 K) oraz w temperaturze -20°C (253 K). Jako trwale definiowano te roztwory, w których ubytek substratu nie przekraczał 10% w porównaniu do wartości początkowej. CFT w powszechnie stosowanych roztworach do podania parenteralnego przechowywanych w temperaturze pokojowej był najbardziej trwały w wodzie do iniekcji oraz w roztworze Ringera, natomiast CFQ w 0,9% roztworze chlorku sodu.

CFT i CFQ są podatne na rozkład w fazie stałej. Kinetyczny mechanizm ich rozkładu w fazie stałej nie zależy od warunków przechowywania i zachodził zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu względem stężenia substratu. Wyznaczono obserwowane stałe szybkości reakcji rozkładu dla RH = 0% oraz RH = 76,4% w czterech temperaturach, a następnie obliczono parametry termodynamiczne zachodzących reakcji oraz określono wpływ wilgotności względnej powietrza na trwałość obu związków.

## Evaluation of stability of some cephalosporines for veterinary use

*Department of Pharmaceutical Chemistry*

*Poznan University of Medical Sciences, Grunwaldzka Street 6, 60-780 Poznań*

The aim of these studies was to evaluate the stability of ceftiofur sodium (CFT) and cefquinome sulfate (CFQ) in aqueous solutions (general and specific acid-base catalysis), in intravenous solutions and in solid state. An HPLC method with UV detection was employed to determine the changes in the concentration of the above mentioned antibiotics. The separation of CFT and CFQ in the presence of their degradation products was obtained using the following parameters:

- column:
  - ceftiofur sodium: LiChroCart (5  $\mu$ m) 250  $\times$  4.6 mm, Merck Darmstadt, Germany
  - cefquinome sulfate: LiChroCart (5  $\mu$ m) 125  $\times$  4.6 mm, Merck Darmstadt, Germany
- mobile phase:
  - ceftiofur sodium: 0.02 mol/l phosphate buffer (pH 6.0) – acetonitrile (78:22 V/V)
  - cefquinome sulfate: 0.02 mol/l phosphate buffer (pH 7.0) – acetonitrile (90:10 V/V)
- flow rate: 1.0 ml/min
- detector: spektrofotometer UV,  $\lambda = 292$  nm (CFT) and 268 nm (CFQ)
- column temperature: 303 K

Both methods were validated with regard to selectivity, linearity, precision, limit of detection and limit of quantitation.

The kinetics of CFT and CFQ degradation were studied in aqueous solutions at pH 0.44–13.57 at 323 K (ceftiofur sodium) and 343 K (cefquinome sulfate). The degradation of CFT and CFQ in aqueous solutions was a pseudo-first-order reaction described by the following equation:

$$\ln c_t = \ln c_0 - k_{\text{obs}} \cdot t$$

Investigation of the influence of the total concentrations of buffer components at constant pH and ionic strength on the  $k_{\text{obs}}$  demonstrated catalytic effect of components of phosphate buffer

(pH 1.54 – 2.95) (CFT i CFQ) and components of acetate buffer (pH 3.66 – 5.47) and borate buffer (pH 7.52 – 10.48) (CFQ).

In the other solutions general acid-base catalysis occurred.

On the specific acid-base catalysis of CFT and CFQ degradation involved: hydrolysis catalyzed by hydrogen and hydroxide ions and spontaneous hydrolysis under the influence of water. All reactions depend on the substrate charge. The catalytic rate constants of the partial reactions were determined from appropriate equations.

In the specific acid-base catalysis CFT is the most stable in pH range 2–7, and CFQ 3–5.5.

The stability study of CFT and CFQ in parenteral solutions was conducted in 11 solutions stored at room temperature (293 K), at 2–8°C (~279 K) and at -20°C (253 K). Solutions in which the loss of substrate concentration did not exceed 10% of the initial concentration were defined as stable. It was found that CFT at room temperature was the most stable in water for injection and Ringer solution, and CFQ in 0.9% sodium chloride solution.

CFT and CFQ are susceptible to degradation in the solid state. The kinetic mechanism of their degradation does not depend on storage conditions and was a first order reaction depending on the substrate concentration. The observed rate constants for the degradation at RH = 0% and RH = 76.4% in four temperatures were determined. Thermodynamic parameters and the influence of air humidity on the stability of both analyzed compounds was determined.

## 8. PIŚMIENNICTWO

---

1. Zając M., Jelińska A.:  
*Chemia leków wczoraj i dziś. Osiągnięcia w chemii leków*  
Wydawnictwo Kontekst, Poznań 2007.
2. Oficjalna strona internetowa Nagrody Nobla,  
[http://www.nobleprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1939/domagk.html](http://www.nobleprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1939/domagk.html)  
data wejścia 15.05.2013
3. Jeśmian C., Młudzik A., Cybulska M.:  
*Historia odkrycia antybiotyków i sulfonamidów*  
Pol. Merkuriusz Lek. 2011; 179: 320–322.
4. Hońdo Ł.:  
*Od odkrycia antybiotyków do europejskiego dnia wiedzy o antybiotykach*  
Aptekarz Polski 2009; 38/16, online.
5. Ziółkowski G., Czechowska D., Czechowski M.:  
*Grzyby produkujące złoto*  
Pielęgniarka epidemiologiczna informator 2008; 32 (5): 18–21.
6. Janiec W.:  
*Farmakodynamika leków stosowanych w zakażeniach i chorobach inwazyjnych, Farmakodynamika. Podręcznik dla studentów farmacji, Tom 2*  
Wydawnictwo Lekarskie PZWL: 1087–1095, 1114–1123, Warszawa 2008.
7. Zając M., Pawełczyk E., Jelińska A.:  
*Chemia leków*  
Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2006.
8. Garrod L. P., Lambert H. P., O'Grady F.:  
*Antybiotyko- i chemioterapia,*  
Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1983.
9. Dzierżanowska D.:  
*Antybiotyki cefalosporynowe*  
Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, Kraków 1997.
10. Bergogne B.E.:  
*Oral Cephalosporins in the treatment of respiratory tract infection*  
Curr. Ther. Res. 1996; 57: 87–96.
11. Abraham D.J., Burger's:  
*Medicinal Chemistry and Drug Discovery. Vol. 5, Chemotherapeutic Agents*  
A John Wiley and Sons Inc., Publication, 2003.

12. Dancer S.J.:  
*The problem with cephalosporins*  
J. Antimicrob. Chemoth. 2001; 48: 463–478.
13. Weil J., Miramonti J., Ladish M.R.:  
*Cephalosporin C: Mode of action and biosynthetic pathway*  
Enzyme Microb. Tech. 1995; 17: 85–87.
14. James P.A., Reeves M.:  
*Bacterial resistance to cephalosporines as a function of outer membrane permeability and access to their target*  
J. Chemother. 1996; 8 (Suppl 2): 37–47.
15. Sanders W.E., Tenney J.H., Kessler R.E.:  
*Efficacy of cefepime in the treatment of infections due to multiply resistant Enterobacter species*  
Clin. Infect. Dis. 1996; 23: 454–461.
16. Livermore D.M., Yuan M.:  
*Antibiotic resistance and production of extended-spectrum beta-lactamases amongst Klebsiella spp. from intensive care units in Europe*  
J. Antimicrob. Chemother. 1996; 38: 409–424.
17. Marshall W.F., Blair J.E.:  
*The Cephalosporins, Symposium on Antimicrobial Agents – Part V*  
Mayo Clin. Proc. 1999; 74: 187–195.
18. Norrby S.R.:  
*Side effects of cephalosporines*  
Drugs 1987; 34 (Suppl 2): 105–120.
19. Fekety F.R.:  
*Safety of parenteral third-generation cephalosporins*  
Am. J. Med. 1990; 88(Suppl 4A): 8S–44S.
20. Thompson J.W., Jacobs R.F.:  
*Adverse effects of newer cephalosporins: an update*  
Drug Saf. 1993; 9: 132–142.
21. Schichor A., Bernstein B., Welnerman H., Fitzgerald J., Yordan E., Schechter N.:  
*Lidocaine as a diluent for ceftriaxone in the treatment of gonorrhea: does it reduce the pain of the injection?* Arch. Pediatr. Adolesc. Med. 1994; 148: 72–75.
22. Anne S., Reisman R.E.:  
*Risk of administering cephalosporin antibiotics to patients with histories of penicillin allergy*  
Ann. Allergy Asthma Immunol. 1995; 74: 167–170.
23. Goddard J.K., Janning S.W., Gass J.S., Wilson R.F.:  
*Cefuroxime-induced acute renal failure*  
Pharmacotherapy 1994; 14: 488–491.
24. Park H.Z., Lee S.P., Schy A.L.:  
*Ceftriaxone-associated gallbladder sludge: identification of calcium-ceftriaxone salt as a major component of gallbladder precipitate*  
Gastroenterology 1991; 100: 1665–1670.
25. Creel G.B., Hurtt M.:  
*Cephalosporine-induced recurrent aseptic meningitis*  
Ann. Neurol. 1995; 37: 815–817.



26. Roliński Z.:  
*Antybiotyki betalaktamowe: penicyliny i cefalosporyny, Farmakologia i farmakoterapia weterynaryjna*  
2 PWRIL, Warszawa 2001.
27. Wernick M.B., Müntener C.R.:  
*Cefovecin: A New Long-acting Cephalosporin*  
J. Exot. Pet Medicine 2010; 19 (4): 317–322.
28. Kania B.:  
*Antybiotyki betalaktamowe – penicyliny, Cefalosporyny i cefamycyny oraz karbapenemy i monobaktamy. Praktyczna chemioterapia weterynaryjna, Wydawnictwo MEDYK, Warszawa 2005.*
29. Convenia, Europejska Agencja Leków,  
[http://www.ema.europa.eu/docs/pl\\_PL/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/veterinary/000098/WC500062067.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pl_PL/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000098/WC500062067.pdf), data wejścia 07.02.2013.
30. Scientific Advisory Group on Antimicrobials of the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use: *Use of cephalosporins in food producing animals*  
J. Vet. Pharmacol. Therap. 2009; 32: 515–533.
31. Stanowisko rządu polskiego przyjęte przez Komitet Europejski Rady Ministrów dnia 3 marca 2006 r. w sprawie Raportu Komisji Europejskiej z rekomendacji 2002/77/ EC w sprawie racjonalnego stosowania antybiotyków.
32. Decision No 1350/2007/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2007 establishing a second programme of Community action in the field of health (2008-13). (Text with EEA relevance).
33. Dzierżawski A., Cybulski W.:  
*Potrzeba racjonalnego stosowania antybiotyków w praktyce weterynaryjnej*  
Życie Weterynaryjne 2012; 87(4): 316–321.
34. Mołbak K.:  
*Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans – the public health consequences*  
J. Vet. Med. B 2004; 51: 364–369.
35. Ungemach F.R.:  
*Figures on quantities of antibacterials used for different purposes in the EU countries and interpretation*  
Acta Vet. Scand. 2000; 93, Suppl.: 89–103.
36. Burton P.J., Thornsberry C., Yee Y.Y., Watts J.L., Yancey R.J. Jr.:  
*Interpretive criteria for antimicrobial susceptibility testing of ceftiofur against bacteria associated with swine respiratory disease*  
J. Vet. Diagn. Invest. 1996; 8(4): 464–468.
37. Excenel, Ogólnopolski Serwis Weterynaryjny - Vademecum Leków,  
<http://www.veterynaria.pl/leki.php?cmd=info&id=719>, data wejścia 17.05.2013.
38. Halstead S.L., Walker R.D., Baker J.C., Holland R.E., Stein G.E., Hauptman J.G.:  
*Pharmacokinetic Evaluation of Ceftiofur in Serum, Tissue Chamber Fluid and Bronchial Secretions from Healthy Beef-bred Calves*  
Can. Res. J. Vet. 1992; 56 (4): 269–274.
39. Charakterystyka produktu leczniczego weterynaryjnego - Naxcel, Europejska Agencja Leków (EMA),  
[http://www.ema.europa.eu/docs/pl\\_PL/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/veterinary/000079/WC500065945.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pl_PL/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000079/WC500065945.pdf), data wejścia: 17.05.2013

40. Salmon S.A., Watts J.L., Yancey R.J. Jr.:  
*In vitro activity of ceftiofur and its primary metabolite, desfurylceftiofur, against organisms of veterinary importance*  
J. Vet. Diagn. Invest. 1996; 8 (3): 332–336.
41. De Baere S., Pille F., Croubels S., Ceelen L., De Backer P.:  
*High-performance liquid chromatographic-UV detection analysis of ceftiofur and its active metabolite desfuroylceftiofur in horse plasma and synovial fluid after regional intravenous perfusion and systemic intravenous injection of ceftiofur sodium*  
Anal. Chim. Acta 2004; 512: 75–84, 2004.
42. Wykaz produktów leczniczych weterynaryjnych dopuszczonych do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej, URPLW MiPB,  
[http://www.urpl.gov.pl/system/article\\_attachments/attachments/3070/original/Wykaz\\_2012\\_zal\\_4.pdf?1331310187](http://www.urpl.gov.pl/system/article_attachments/attachments/3070/original/Wykaz_2012_zal_4.pdf?1331310187), data wejścia 17.05.2013.
43. Quale J., Bratu S., Landman D., Heddurshetti R.:  
*Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii endemic in New York City*  
Clin. Infect. Dis. 2003; 37: 214–220.
44. Zhihui H., Yanling W., Shusheng T., Gang W., Qiu M., Ruili Z., Yuanyuan L., Xilong X.:  
*Optimization of the Process of Gelatin-ceftiofur Sodium Microspheres*  
Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed. , DOI 10.1007/s11595-010-0132-x p. 975–978, 2010.
45. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA)  
*Cefquinome formulations for parenteral injection for the treatment of bovine respiratory disease*  
<http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/VeterinaryMedicine/AdvisoryCommittee/UCM126616.pdf>, data wejścia: 17.05.2013.
46. Europejska Agencja Leków (EMA) *Cefkwinom*  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500011877.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500011877.pdf), data wejścia: 17.05.2013.
47. Interaktywny Katalog Witamin i Leków  
*Cobactan*  
<http://www.citovet.pl/pl4/index.php?p=productsMore&iProduct=177&sName=cobactan-174>, data wejścia 17.05.2013.
48. Amiridis G.S., Fthenakis G.C., Dafopoulos J., Papanikolaou T., Mavrogianni V.S.:  
*Use of cefquinome for prevention and treatment of bovine endometritis*  
J. Vet. Pharmacol. Ther. 2003; 26 (5): 387–390.
49. Winther L., Baptiste K.E., Friis C.:  
*Antimicrobial disposition in pulmonary epithelial lining fluid of horses, Part III. Cefquinome*  
J. Vet. Pharmacol. Ther. 2011; 34 (5): 482–486.
50. Europejska Agencja Leków (EMA)  
*Ceftiofur*  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500011904.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500011904.pdf), data wejścia: 17.05.2013.
51. Cybulski W.:  
*Pozostałości leków weterynaryjnych w żywności - rozważania toksykologiczne*  
Biuletyn LILW 2006; 3: 20–22.

52. Le Breton M.H., Savoy- Perroud M.C., Diserens J.M.:  
*Validation and comparison of the Copan Milk Test and Delvotest SP-NT for the detection of antimicrobials in milk*  
Anal. Chim. Acta 2007; 586: 280–283.
53. Farmakopea Polska Wydanie IX, Tom I, Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, Warszawa 2011.
54. Pikkemaat M. G.:  
*Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals*  
Anal. Bioanal. Chem. 2009; 395 (4): 893–905.
55. Masztis P.S.:  
*Antibiotic Residue Testing in a Beef Slaughterhouse*  
Can. Vet. J. 1984; 25: 329–330.
56. McEwen S.A., Black W.D., Meek A.H.:  
*Antibiotic residues (bacterial inhibitory substances) in the milk of cows treated under label and extra-label conditions*  
Can. Vet. J. 1992; 33: 527–534.
57. Althaus R.L., Molina M.P., Rodriguez M., Fernandez N.:  
*Detection Limits of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Ewe Milk by Penzym Enzymatic Test*  
J. Food. Prot. 2001; 64 (11): 1844–1847.
58. Hozová B., Minarovičová L.:  
*Verification of Suitability of Selected Detection Systems for Estimating Antibiotic Residues in Goat's Milk*  
Czech J. Food Sci. 2001; 19 (6): 207–212.
59. Różańska H.:  
*Opinia Laboratorium Referencyjnego - Zakładu Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach na temat przydatności testu Charm ROSA MRL BL/TET Test do wykrywania pozostałości antybiotyków  $\beta$ -laktamowych i tetracyklin w mleku*  
09/10920/ZHZ/1862 Puławy 2008.09.03.
60. Perme T., Bizjak M., Šinigoj Gačnik K., Kirbiš A.:  
*Validation of Twinsensor<sup>BT</sup>, screening test for the detection of  $\beta$ -lactams and tetracyclines in milk and comparison to Delvotest<sup>®</sup> SP-NT*  
Slov. Vet. Res. 2010; 47 (3): 97–106.
61. Reybroeck W., Ooghe S., De Brabander H.F., Daeseleire E.:  
*Validation of the  $\beta$ -s.t.a.r. 1+1 for rapid screening of residues of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk*  
Food Addit. Contam. 2010; 27 (8): 1084–1095.
62. Lamar J., Petz M.:  
*Development of a receptor-based microplate assay for the detection of beta-lactam antibiotics in different food matrices*  
Anal. Chim. Acta 2007; 586: 296–303.
63. Wydział Polityki Społecznej i Zdrowia Opolskiego Urzędu Wojewódzkiego  
*Metody immunochemiczne z zastosowaniem znacznika*  
[http://www.wps-zdrowie.opole.uw.gov.pl/pliki/files/diadnosci\\_metody.pdf](http://www.wps-zdrowie.opole.uw.gov.pl/pliki/files/diadnosci_metody.pdf), data wejścia 30.04.2013.
64. Bremus A., Dietrich R., Dettmar L., Usleber E., Märtilbauer E.:  
*A broadly applicable approach to prepare monoclonal anti-cephalosporin antibodies for immunochemical residue determination in milk*  
Anal. Bioanal. Chem. 2012; 403: 503–515.

65. Thal J., Steffen M., Meier B., Schneider E., Adriany A., Usleber E.:  
*Development of an enzyme immunoassay for the antibiotic cefquinome and its application for residue determination in cow's milk after therapeutical mastitis treatment*  
Anal. Bioanal. Chem. 2011; 399: 1051–1059.
66. Toaldo I.M., Gamba G.Z., Picinin L.A., Rubensam G., Hoff R., Bordignon-Luiz M.:  
*Multiclass analysis of antibacterial residues in milk using RP-liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection and tandem mass spectrometer confirmation*  
Talanta 2012; 99: 616–624.
67. Karageorgou E.G., Samanidou V.F.:  
*Application of ultrasound-assisted matrix solid-phase dispersion extraction to the HPLC confirmatory determination of cephalosporin residues in milk*  
J. Sep. Sci. 2010; 33: 2862–2871.
68. Beconi-Barker M., Roof a R.D., Millerioux L., Kausche F.M, Vidmar T.J., Smith E.B., Callahan J.K., Hubbard V.L., Smith G.A., Gilbertson T.J.:  
*Determination of ceftiofur and its desfuroylceftiofur-related metabolites in swine tissues by high-performance liquid chromatography*  
J. Chromatogr. B 1995; 673: 231–244.
69. Chung H.S. Jung W.C., Kim D.H., Lim J.J., Son H.Y., Kim S., Lee H.J.:  
*Ceftiofur Distribution in Plasma and Tissues Following Subcutaneously Administration in Ducks*  
J. Vet. Med. Sci. 2007; 69 (10): 1081–1085.
70. Sørensen L.K., Snor L.K.:  
*Determination of cephalosporins in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography*  
J. Chromatogr. A 2000; 882: 145–151.
71. Suhren G., Knappstein K.:  
*Detection of cefquinome in milk by liquid chromatography and screening methods*  
Anal. Chim. Acta 2003; 483: 363–372.
72. Verdon E., Couëdor P.:  
*HPLC/UV determination of residues of cephalosporins in pork and beef muscle tissues, AFSSA-Fougères, Laboratory for Researches and Studies on Veterinary Drugs and Disinfectants*  
Community Reference Laboratory for Antimicrobial Residues in Food from Animal Origin, BP 90203, 35302 Fougères, FRANCE.
73. McNeilly P.J., Reeves V.B., Ian Deveau E.J.:  
*Determination of Ceftiofur in Bovine Milk by Liquid Chromatography*  
J. AOAC Int. 1996; 79 (4): 844–847.
74. Keever J., Voyksner R.D., Tyczkowska K.:  
*Quantitative determination of ceftiofur in milk by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry*  
J. Chromatogr. A 1998; 794: 57–62.
75. Wasik A., Wasik-Kot A.:  
*Połączenie techniki LC ze spektrometrią mas*  
[http://www.pg.gda.pl/chem/Dydaktyka/Analityczna/LC/Polaczenie\\_LC-MS.pdf](http://www.pg.gda.pl/chem/Dydaktyka/Analityczna/LC/Polaczenie_LC-MS.pdf) data wejścia: 29.04.2013.
76. Szczepaniak W.:  
*Etapy procesu analitycznego, Spektroskopia mas. Metody instrumentalne w analizie chemicznej*  
Wydawnictwo Naukowe PWN SA, s. 25–38, 345–357, Warszawa 2002.

77. Feng S., Chattopadhyaya C., Kijak P., Chiesa O.A., Tall E.A.:  
*A determinative and confirmatory method for ceftiofur metabolite desfuoylceftiofur cysteine disulfide in bovine kidney by LC-MS/MS*  
J. Chromatogr. B 2012; 898; 62–68.
78. Nakajima T., Sasamoto T., Hayashi H., Kanda M., Takeba K., Kanai S., Kusano T., Matsushima Y., Takano I.:  
*Screening Assay of Residual Antibiotics in Livestock Samples by LC-MS/MS*  
Food Hyg. Saf. Sci. 2012; 53 (2): 91–97.
79. Maes A., Meyns T., Sustronck B., Maes D., De Backer P., Croubels S.:  
*Determination of cefquinome in pig plasma and bronchoalveolar lavage fluid by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry*  
J. Mass Spectrom. 2007; 42: 657–663.
80. Junza A., Amatya R., Pérez- Burgos R., Gokce G., Grzelak E., Barrón D., Barbosa J.:  
*Residues of  $\beta$ -lactams and quinolones in tissues and milk samples. Confirmatory analysis by liquid chromatography–mass spectrometry*  
Ovidius University Annals of Chemistry 2010; 21 (2): 109–122.
81. Zając M., Muszalska I., Nogowska M, Siwek J.:  
*Kinetics of hydrolysis of ceftriaxone in aqueous solutions*  
Pharmazie 1996; 51: 227–230.
82. Zając M., Stanisław B.:  
*Stability of cefuroxime (CF) in aqueous solutions*  
Acta Pol. Pharm. 1994; 51 (2): 127–132.
83. Siwek J., Zając M.:  
*Kinetics of hydrolysis of ceftazidime in aqueous solutions*  
Acta Pol. Pharm. 1995; 52 (1): 21–30.
84. Zalewski P., Cielecka-Piontek J., Jelińska A.:  
*Stability of cefoselis sulfate in aqueous solutions*  
Reac. Kinet. Mech. Cat. 2013; 108: 285–292.
85. Jelińska A., Dobrowolski L., Oszczapowicz I.:  
*The influence of pH, temperature and buffers on the degradation kinetics of cefetamet pivoxil hydrochloride in aqueous solutions*  
J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 2004; 35:1273–1277.
86. Zając M., Jelińska A., Dobrowolski L., Oszczapowicz I.:  
*Evaluation of stability of cefuroxime axetil in solid state*  
J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 2003; 32: 1181–1187.
87. Jelińska A., Didzińska I., Zając M., Oszczapowicz I.:  
*The stability of the amorphous form of cefuroxime axetil in solid state*  
J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 2006; 41: 1075–1081.
88. Jelińska A., Dudzińska I., Zając M., Oszczapowicz I., Krzewski W.:  
*The stability of cefuroxime axetil in tablets*  
Acta Pol. Pharm. 2005; 62 (3): 183–187.
89. Jelińska A., Zając M., Jakubowska M.:  
*Kinetics of cefuroxime sodium salt decay in solid phase*  
React. Kinet. Catal. Lett. 2001; 73 (2): 325–331.
90. Jelińska A., Zając M., Dobrowolski L., Medenecka B., Ruciński P., Oszczapowicz I.:  
*Kinetics of degradation of cefetamet pivaloyloxymethyl ester and its hydrochloride in solid phase*  
Acta Pol. Pharm. 2003; 60 (6): 435–441.

91. Zając M., Jelińska A., Sobczak A., Musiał W.:  
*Stability of Cefprozidime Pentahydrate in medical preparations Biotum and Ceftim*  
Acta Pol. Pharm. 2005; 62 (1): 11–15.
92. Zając M., Jelińska A., Zalewski P.:  
*Stability of ceftriaxone disodium in Biotraxon and Tartraxon*  
Acta Pol. Pharm. 2005; 62 (2): 89–94.
93. Zając M., Musiał W., Dederko A.:  
*Stability of cefodizime disodium in solid state*  
Acta Pol. Pharm. 2001; 58 (4): 245–248.
94. Musiał W., Zając M.:  
*Stability of cefepime dihydrochloride monohydrate in solid state*  
Acta Pol. Pharm. 2002; 59 (4): 243–246.
95. Zalewski P., Skibiński R., Cielecka-Piontek J.:  
*Stability studies of ceftiofome sulfate in the solid state: Identification of degradation products*  
J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 2014; 92: 22–25.
96. Souza M.J., Souza Filho P.S., Adams A.I.H., Bergold A.M.:  
*Photodegradation Kinetics of Sodium Ceftiofur in Aquous Solutions Determined by LC Method*  
The Open Antimicrob. Agent. J. 2010; 2: 1–7.
97. Garbacki P., Dołhań A., Jelińska A.:  
*Opracowanie metody HPLC do badania trwałości ceftiofuru sodowego*  
XXII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Bałystok 2013.
98. Gans P., Sabatini A., Vacca A.:  
*Hyperquad*  
Talanta 1996; 43:1739–1753.
99. Zając M., Jelińska A.:  
*Ocena jakości substancji i produktów leczniczych*  
Wydawnictwo Naukowe UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2010.
100. University of Hertfordshire  
*VSDB: Veterinary Substances DataBase*  
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/Reports/1822.htm>, data wejścia: 19.05.2012.
101. Dołhań A., Jelińska A., Bębenek M.:  
*Stability of ceftiofur sodium and ceftiofomesulphate in intravenous solutions*  
Sci. World J. 2014; Vol. 2014, art. ID 583461: 1-8.