

Monika Pawłowska

Trwałość cefepimu w kroplach do oczu

Rozprawa doktorska

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

Promotor rozprawy

dr hab. farm. Anna Kodym

Poznań 2013

*Pragnę serdecznie podziękować
Promotorowi dr hab. farm. Annie Kodym
za podanie tematu, opiekę, pomoc oraz za cenne rady
w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej.*

*Pragnę serdecznie podziękować
Pani dr farm. Helenie Kukule
z Katedry i Zakładu Bakteriologii Farmaceutycznej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu za przeprowadzenie oceny mikrobiologicznej
rozsuszczałników.*

*Pragnę serdecznie podziękować
mojemu mężowi Dawidowi i córce Abigail
za wyrozumiałość i cierpliwość.*

*Pragnę również serdecznie podziękować
Rodzicom za ich nieocenione wsparcie.*

Spis treści

I. WSTĘP	9
II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	10
1. Nowoczesne postacie leków okulistycznych o działaniu miejscowym dostępne na rynku farmaceutycznym.....	10
1.1. Hydrożele do oczu.....	10
1.2. Inserty.....	11
1.3. Układy mikrokompartmentowe jako nośniki leków do oczu.....	13
1.3.1. Mikrocząstki i nanocząstki jako okulistyczna postać leku.....	13
1.3.2. Liposomy	15
1.3.3. Emulsje submikronowe	16
1.3.4. Mikroemulsje	16
1.3.5. Liofilizacyjny system do oczu – suche krople do oczu – OLCS.....	16
1.3.6. Leki prekursorowe. Promotory wchłaniania.....	16
2. Cefalosporyny IV generacji.....	18
2.1. Budowa chemiczna cefalosporyn IV generacji	18
2.2. Mechanizm działania cefalosporyn IV generacji	20
2.3. Cefepim – wpływ właściwości fizykochemicznych na spektrum przeciwdrobnoustrojowe. Zastosowanie w leczeniu.....	20
2.4. Farmakokinetyka cefepimu	23
2.5. Działania niepożądane i przeciwwskazania do stosowania cefepimu.....	24
2.6. Preparaty handlowe zawierające cefepim	25
2.7. Zgodność cefepimu z substancjami leczniczymi i pomocniczymi	26
2.8. Ocena stabilności cefepimu w roztworach wodnych.....	27
2.9. Przegląd wybranych metod instrumentalnych zastosowanych do identyfikacji jakościowej i ilościowej cefepimu w matrycach różnego pochodzenia.....	29
3. Produkty rozkładu cefepimu.....	32
3.1. Dotychczasowy stan badań nad produktami rozkładu cefepimu.....	32
3.2. N-metylopirolidyna jako główny produkt rozkładu cefepimu.....	33
3.3. Oznaczanie N-metylopirolidyny w postaciach leków z cefepimem.....	35
4. L-arginina jako składnik handlowej postaci leku z cefepimem	37
III. CEL PRACY	38
IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	39

1. Materiał do badań	39
2. Substancje pomocnicze i odczynniki użyte do badań	40
3. Sprzęt i aparatura.....	41
4. Przygotowanie oraz ocena właściwości fizykochemicznych roztworów substancji pomocniczych zastosowanych w badaniach.....	43
4.1. Składniki i sporządzanie roztworów buforowych przeznaczonych do recepturowych 1% i 5% (w/w) kropli do oczu z cefepimem.....	43
4.2. Skład i sporządzanie roztworów alkoholu poliwinylowego (PVA) przeznaczonych do 1% i 5% (w/w) recepturowych kropli do oczu z cefepimem.....	44
4.3. Sporządzanie roztworów pomocniczych substancji konserwujących.....	45
4.3.1. 0,04% roztwór boranu fenylortęciowego (50,0 g).....	45
4.3.2. 2% roztwór tiomersalu (20,0 g).....	45
4.3.3. 0,5% roztwór chlorku benzalkoniowego (50,0 g).....	45
4.3.4. 1% roztwór dioctanu chlorheksydydy (50,0 g).....	45
4.3.5. Alkohol β-feniloetylowy (20,0 g).....	45
5. Ocena zgodności farmaceutycznej 1% i 5% roztworów wodnych cefepimu ze środkami pomocniczymi zastosowanymi w badaniach.....	46
6. Aseptyczne sporządzanie recepturowych 1% i 5% (w/w) kropli do oczu z cefepimem w warunkach aseptycznych.....	47
6.1. Czynności przygotowawcze do pracy w warunkach aseptycznych.....	47
6.2. Sporządzanie 1% i 5% (w/w) wodnych roztworów cefepimu oraz 1% i 5% (w/w) kropli do oczu.....	48
6.2.1. Sporządzanie 1% i 5% (w/w) wodnych roztworów cefepimu: wersje (0 _{1%}) i (0 _{5%}).....	50
6.2.2. Sporządzanie 1% i 5% kropli do oczu z cefepimem: wersje recepturowe nr 1R, IR i IaR.....	50
6.2.3. Sporządzanie 1% i 5% kropli do oczu z cefepimem: wersja recepturowa nr 2R.....	50
6.2.4. Sporządzanie 1% i 5% kropli do oczu z cefepimem: wersje recepturowe nr 3R, 3aR, IIIIR, IIIaR.....	51
6.2.5. Sporządzanie 1% i 5% kropli do oczu z cefepimem: wersje recepturowe nr 4R, 4aR, IVR, IVaR, IVbR.....	51

6.2.6. Uzasadnienie zaprogramowanego składu wersji recepturowych kropli do oczu z 1% i 5% (w/w) zawartością cefepimu.....	51
7. Ocena fizykochemiczna oraz wyniki oceny jakościowej 1% i 5% roztworów wodnych oraz 1% i 5% recepturowych kropli do oczu z cefepimem świeżo sporządzonych oraz w czasie przechowywania przez 30 dni w temp.4°C i 20°C.....	53
7.1. Badania organoleptyczne.....	53
7.2. pH roztworów wodnych oraz kropli	53
7.3. Ciśnienie osmotyczne.....	53
7.4. Gęstości i lepkość kropli.....	53
8. Oznaczanie stężenia cefepimu metodą HPLC w 1% i 5% roztworach wodnych, w 1% i 5% recepturowych kroplach oraz w 1% i 5% kroplach „przemysłowych” świeżo sporządzonych i w czasie przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.....	61
8.1. Przygotowanie eluenta.....	61
8.2. Przygotowanie układu chromatograficznego.....	62
8.3. Wymagane i uzyskane parametry rozdziału chromatograficznego.....	62
8.4. Przygotowanie krzywych kalibracyjnych dla oznaczeń ilościowych cefepimu metodą wzorca zewnętrznego.....	63
8.5. Oznaczanie zawartości cefepimu w preparacie Maxipime®inj.....	70
8.6. Tożsamość cefepimu w badaniach trwałości roztworów i kropli.....	70
8.7 Walidacja metody HPLC oznaczania cefepimu w 1% i 5% roztworach wodnych oraz kroplach recepturowych i „przemysłowych”	71
8.7.1. Specyficzność.....	71
8.7.2. Dokładność.....	73
8.7.3. Precyzja.....	73
8.7.4. Liniowość metody.....	81
8.7.5. Granica wykrywalności (DL).....	81
8.7.6. Granica oznaczalności (QL).....	81
8.7.7. Elastyczność metody.....	82
8.8. Analiza stężenia cefepimu w 1% i 5% (w/w) wodnych roztworach, w 1% i 5% kroplach recepturowych oraz w 1% i 5% kroplach „przemysłowych”, świeżo sporządzonych i w czasie przechowywania w temp.4°C i 20°C.....	84
8.8.1. Tok analityczny	84
8.8.2. Parametry analizy chromatograficznej.....	85

8.8.3. Wyniki badań stężenia cefepimu w 1% i 5% wodnych roztworach, w 1% i 5% kroplach recepturowych oraz w 1% i 5% kroplach „przemysłowych” świeżo sporządzonych i w czasie przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C	86
9. Skład, sposób sporządzania i właściwości fizykochemiczne rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% (w/w) kropli „przemysłowych”. Ocena skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej środków konserwujących w rozpuszczalnikach...	117
9.1. Skład rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% (w/w) kropli „przemysłowych”	117
9.2. Sposób sporządzania rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych”	117
9.3. Ocena fizyczna rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych” świeżo sporządzonych oraz poddanych testowi długoterminowemu i testowi przyspieszonego starzenia.....	118
9.4. Badanie skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej środków konserwujących w rozpuszczalnikach przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych”	125
10. Aseptyczne sporządzanie i badanie 1% i 5% kropli „przemysłowych”	127
10.1. Skład 1% i 5% kropli „przemysłowych” z cefepimem.....	127
10.2. Tok postępowania przy sporządzeniu 1% i 5% „ przemysłowych” kropli z cefepimem.....	127
10.3. Ocena fizykochemiczna 1% i 5% kropli „przemysłowych” przygotowanych przy użyciu rozpuszczalników świeżo sporządzonych oraz poddanych testowi przyspieszonego starzenia (6 miesięcy w temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH).....	128
10.3.1. Ocena organoleptyczna.....	128
10.3.2. pH 1% i 5% kropli „przemysłowych”	128
10.3.3. Analiza ciśnienia osmotycznego w 1% i 5% kroplach „przemysłowych”	128
10.3.4. Gęstość oraz lepkość 1% i 5% kropli „przemysłowych”	128
10.3.5. Wyniki badań stężenia cefepimu w 1% i 5% kroplach „przemysłowych” z oceną statystyczną (trwałość cefepimu w kroplach „przemysłowych”)..	128
11. Produkt rozkładu cefepimu w 1% i 5% w kroplach do oczu przechowywanych w temp. 4°C i 20°C.....	149

V. OMÓWIENIE WYNIKÓW	152
VI. WNIOSKI	170
VII. STRESZCZENIE	173
VII. SUMMARY	176
VIII. PIŚMIENICTWO	179
IX. SPIS TABEL	190
X. SPIS RYCIN	197

I. WSTĘP

Cefepim - cefalosporyna IV generacji charakteryzuje się szerokim zakresem działania bakteriobójczego wobec drobnoustrojów Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, w tym wykazuje aktywność w stosunku do większości szczepów opornych na aminoglikozydy i cefalosporyny III generacji. Do najważniejszych właściwości cefepimu należy jego szerokie spektrum przeciwdrobnoustrojowe oraz wyjątkowa oporność na działanie β -laktamaz plazmidowych i chromosomalnych. Cefepim stosowany jest dożylnie lub domięśniowo w leczeniu ciężkich zakażeń dróg oddechowych, układu moczowego, zakażeń skóry, tkanek miękkich, jamy brzusznej i dróg żółciowych. W uzasadnieniu zastosowania cefepimu w kroplach do oczu wzięto pod uwagę szczególne właściwości przeciwdrobnoustrojowe cefepimu, zwłaszcza przeciwko wybitnie niebezpiecznym dla oka szczepom z rodzaju *Pseudomonas*. Zaprezentowana w dysertacji koncepcja technologii 1% i 5% recepturowych i „przemysłowych” kropli do oczu z cefepimem jest propozycją nowatorską, bowiem na polskim i światowym rynku farmaceutycznym nie zarejestrowano do tej pory żadnej okulistycznej postaci leku z cefepimem o działaniu miejscowym. Ponadto w literaturze naukowej brakuje jakichkolwiek informacji dotyczących recepturowych oraz handlowych, okulistycznych postaci leków z cefepimem. Pierwsze naukowe informacje dotyczące recepturowych kropli do oczu z cefepimem zostały opisane w publikacji: „Stability of cefepime in aqueous eye drops” (Pharmazie 2011, 66 (1) 17-23), stanowiącej część prezentowanej dysertacji.

II. Część teoretyczna

1. Nowoczesne postacie leków okulistycznych o działaniu miejscowym dostępne na rynku farmaceutycznym

1.1. Hydrożele do oczu

Zgodnie z definicją FPVI: hydrożele to ciecze hydrofilowe żelowane za pomocą odpowiednich substancji wytwarzających strukturę sieciową.

Krople do oczu mogą zawierać hydrożele w postaci gotowej (o konsystencji półstałej w opakowaniu) lub są to krople, które żelują *in situ* po podaniu na rogówkę. Układy hydrożelowe łatwo mieszają się z płynem łzowym i nie powodują dyskomfortu widzenia.

W technologii hydrożeli do oczu stosuje się polimery naturalne, syntetyczne i półsyntetyczne. Są to polimery o wyższej masie cząsteczkowej i wyższym stężeniu w stosunku do roztworów wodnych o zwiększonej lepkości [1,2].

Żele o konsystencji półstałej tworzą m.in. pochodne celulozy (metyloceluloza, hydroksyetyloceluloza, hydroksypropyloceluloza i hydroksypropylometyloceluloza), także alkohol poliwinylowy (PAV) i kwas hialuronowy w postaci soli sodowej (HA). Do tej grupy zalicza się również poprzecznie usieciowane pochodne kwasu akrylowego, tzw. carbopole, w przypadku których gotowy hydrożel można otrzymać po zobojętnieniu kwasu poliakrylowego rozproszonego w wodzie [3-9].

Kwas hialuronowy jest polimerem o właściwościach mukoadhezyjnych (bioadhezyjnych), ponieważ posiada zdolność niekowalencyjnego wiązania się z cząsteczkami mucyny - glikoproteiny płynu łzowego. Kwas hialuronowy jest składnikiem budulcowym występującym naturalnie w cieple szklistym oka, dlatego wykazuje zgodność biologiczną, brak właściwości alergizujących, działa przeciwzapalnie i wpływa korzystnie na regenerację nabłonka rogówki [10].

Polimery tworzące żele *in situ* noszą miano tzw. inteligentnych polimerów. Niektóre zmieniają konsystencję roztworu pod wpływem zmian temperatury, np. poloksamery (polioksyetylenowane glikole polioksypropylenowe: PEO-PPO-PEO), które w temperaturze pokojowej do 25°C mają postać półpłynną, a w temperaturze ciała ludzkiego (35-37°C) żelują. Opisano połączenia poloksameru z chitozanem zastosowanie w lekach do oczu i żelujące w podwyższonej temperaturze [11]. Do polimerów żelujących pod wpływem wysokiej temperatury, czyli nie w środowisku fizjologicznym, należy również metyloceluloza (40-50°C) i hydroksypropylometyloceluloza (75°C-90°C). Udowodniono, że dodatek NaCl zmniejsza temperaturę żelowania metylocelulozy do 32°C-34°C i w przypadku

hydroksypropylometylocelulozy do 40°C. W grupie związków żelujących pod wpływem temperatury znajduje się też ksyloglukan [12].

Do polimerów żelujących na skutek zmian pH należy octanofalan celulozy (CAP). Polimer żeluje w pH fizjologicznym po połączeniu roztworu z płynem łzowym. Do polimerów żelujących pod wpływem zmiany pH нефизjologicznego zalicza się carbopol (np. Carbopol 974P). W literaturze naukowej opisano połączenie carbopolu z hydroksypropylometylocelulozą (hypromeloza), która zwiększyła lepkość żelu, co wydłużyło działanie leku do 8 h. W niektórych przypadkach kropli z carbopolem przygotowuje się roztwór niezobojętniony lub słabo zobojętniony, który pod wpływem pH płynu łzowego ulega żelowaniu [13].

W przypadku polimerów wrażliwych na elektrolity, do żelowania dochodzi pod wpływem jonów sodu znajdujących się w płynie łzowym (guma Gellan wytwarzana przez *Sphingomonas elodea* – technologia zastosowana w preparacie Tiomptic XE) lub pod wpływem obecnego tam lizozymu (guma ksantonowa wytwarzana przez bakterie *Xanthomonas campestris* - technologia zastosowana w preparacie Timolol GFS) [12].

W preparacie Betoptic połączono polimer z wymiennikiem jonowym. Substancja czynna uwalnia się na skutek wymiany jonów sodu z płynu łzowego z żywicą jonowymienną z kropli hydrożelowych [14].

1.2. Inerty

Inerty, zapewniające przedłużone uwalnianie substancji czynnej, definiuje się jako postać leku o konsystencji stałej lub półstałej w kształcie krążka, okrągłego lub owalnego pierścienia o wielkości dogodnej do aplikacji do oka [15]. Proces uwalniania substancji czynnej z insertu jest dokładnie określony i przebiega zgodnie z kinetyką I rzędu, co powoduje, że szybkość uwalniania substancji czynnej zmniejsza się wraz ze spadkiem jej stężenia w insercie. Inerty charakteryzują się większą trwałością w stosunku do kropli do oczu, zawiesin, maści do oczu i innych postaci leku zawierających wodę. Ponadto nie zawierają środków konserwujących, więc nie wywołują działania drażniącego. Problemy związane z zastosowaniem insertów, będące przyczyną niezbyt popularnego stosowania ich w okulistyce, dotyczą sposobu aplikacji, uczucia ciała obcego w oku oraz zaburzeń widzenia. W przypadku insertów o słabych właściwościach bioadhezyjnych dodatkowym problemem jest ich przemieszczanie się po powierzchni gałki ocznej, co wzmaga uczucie podrażnienia i łzawienie oraz może powodować wypadnięcie insertu z oka. Erozja matrycy i rozpad insertów rozpuszczalnych na mniejsze części skutkuje zaburzeniami widzenia. Do tego dochodzi dość wysoki koszt terapii w porównaniu z kroplami ocznymi [16].

Ze względu na sposób przygotowania oraz skład, inserty dzieli się na rozpuszczalne, nierozpuszczalne i ulegające biodegradacji.

W insertach rozpuszczalnych matryca ma charakter hydrofilowy, dlatego łatwo ulegają one rozpuszczeniu w miejscu aplikacji. Płyn łzowy przenika do matrycy insertu, rozpuszcza substancję leczniczą, która następnie zostaje uwolniona na drodze dyfuzji. W technologii insertów rozpuszczalnych stosuje się polimery naturalne, syntetyczne i półsyntetyczne. Jako naturalne polimery rozpuszczalne stosuje się kolagen, żelatynę i chitynę. Inserty kolagenowe zastosowano m.in. jako nośnik dla pilokarpiny, gentamycyny, deksametazonu, cyklosporyny A, tobramycyny, wankomycyny, indometacyny i 5-fluorouracylu [15].

Polimery syntetyczne i półsyntetyczne stosowane w insertach rozpuszczalnych to m.in. pochodne celulozy i alkohol poliwinylowy [17-18]. Stężenia zastosowanych polimerów są jednak wyższe niż w przypadku hydrożeli. Inserty półsyntetyczne otrzymuje się metodą ekstruzji lub tabletkowania. Substancja lecznicza uwalniana jest na drodze dyfuzji w wyniku napływu płynu łzowego do wnętrza insertu. Przedłużone uwalnianie substancji leczniczej następuje na skutek powstania warstwy żelowej wokół rdzenia insertu. W tej grupie insertów stosuje się dodatki innych polimerów jak etylocelulozę, poliwinylpirolidon (PVP), poliakrylamid oraz kopolimery hydroksypropylcelulozy z poliwinylpirolidonom albo alkoholu poliwinylowego z hydroksypropylometylocelulozą lub akrylan etylu z poliwinylpirolidonom oraz ester malonowy poliwinylometyloeteru. Do grupy insertów rozpuszczalnych należy NODS (z ang. New Ophthalmic Delivery System), zawierający w systemie alkohol poliwinylowy [19].

Do insertów nierozpuszczalnych zalicza się inserty osmotyczne i dyfuzyjne oraz soczewki kontaktowe jako nośniki leków. Inserty osmotyczne mogą być przygotowane w wersji jednozbiornikowej, gdzie substancja czynna znajduje się w polimerowej matrycy z dodatkiem lub bez dodatku substancji osmotycznie czynnej. W wersji dwuzbiornikowej substancja czynna i osmotyczna znajdują się w dwóch zbiornikach oddzielonych elastyczną błoną. Substancja czynna uwalniana jest z systemu zgodnie z kinetyką 0 rzędu. W przypadku insertów dyfuzyjnych obecnie na rynku farmaceutycznym dostępny jest system Pilo-20 lub Pilo-40 uwalniający pilokarpinę z zaprogramowaną szybkością 20 μ g/h lub 40 μ g/h przez 7 dni.

Zastosowanie soczewek kontaktowych jako nośników leku polega na aplikacji specjalnie przygotowanych szkieł miękkich, które otrzymuje się na drodze polimeryzacji substancji czynnej z mieszaniną monomerów. Soczewki na skutek chłonięcia wody uelastyczniają się, dzięki czemu uwalniają substancję czynną [15].

W grupie polimerów stosowanych do produkcji insertów nierozpuszczalnych stosuje się: 2-hydroksylometakrylan połączony z n-winył-2-pirolidonem albo octan etylenowo-winyłowy z alginianem i hydroksyetylometylometakrylanem oraz dimetakrylan glikolu etylenowego. W badaniach *in vitro* zbadano przydatność insertów biodegradowalnych, wykonanych z żelatyny. Do wytwarzania insertów biodegradowalnych wykorzystuje się również poliestry: poliwinylometakrylan (PVMMA) w połączeniu z żelatyną, hydroksypropylocelulozę z poliwiniloalkoholem lub połączenie poliwiniloalkoholu z Carbopolem 940. W celu zwiększenia właściwości mukoadhezyjnych insertów nierozpuszczalnych zastosowano połączenie kwasu poliakrylowego (450kDa) z L-cysteiną, tzw. PAA₄₅₀-CYS insert. Połączenia takie z dobrym skutkiem stały się nośnikami leków m.in. o właściwościach przeciwzapalnych, np. diklofenaku sodu (Rycina 1 i Rycina 2) [20-21].

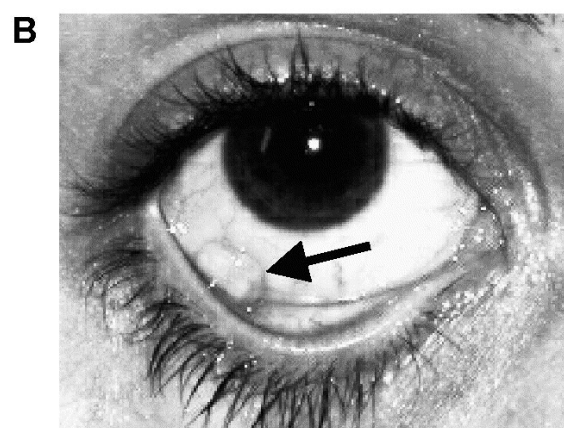
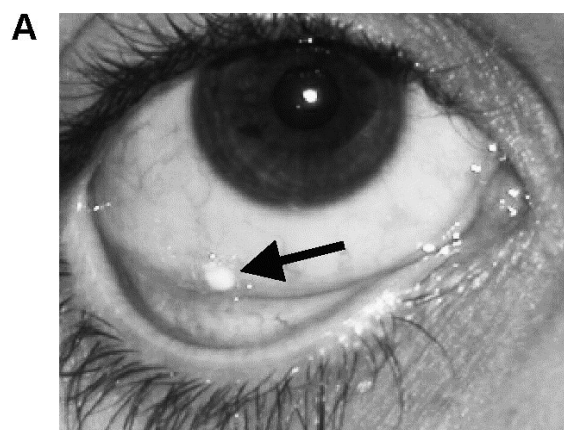
Odmianą insertów, zapewniającą przedłużone uwalnianie substancji leczniczej są minitabletki z matrycą z hydroksypropylocelulozy i palmitynostearynianu glicerolu. Minitabletki powleka się mieszaniną Eudragitów RL/RS. Minitabletki zastosowano jako nośnik dla tymololu [22].

1.3. Układy mikrokompartmentowe jako nośniki leków do oczu

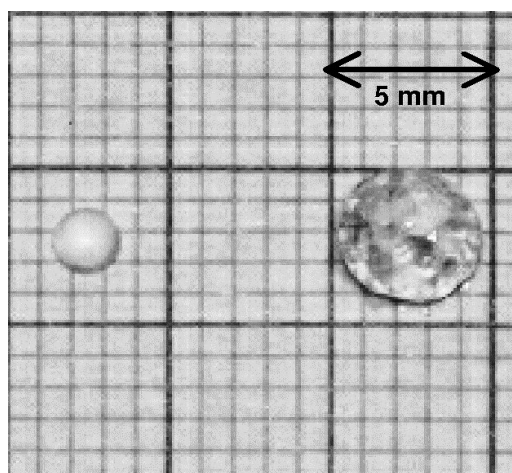
Układy mikrokompartmentowe stosowane jako nośniki substancji leczniczych to mikrocząstki (mikrosfery i mikrokapsułki), nanocząstki (nanosfery i nanokapsułki), liposomy, emulsje submikronowe i mikroemulsje oraz liofilizacyjny system do oczu, czyli OLCS [23].

1.3.1. Mikrocząstki i nanocząstki jako okulistyczna postać leku

W przypadku mikrocząstek i nanocząstek wykonanych z polimerów pęczniejących lub nierozpuszczalnych w wodzie, substancja lecznicza dyfunduje z matrycy. W układach wykonanych z polimerów rozpuszczalnych, ulegających degradacji w środowisku wodnym płynu łzowego, substancja lecznicza uwalnia się na skutek erozji matrycy. Substancja lecznicza z mikrokapsulek i nanokapsulek jest również uwalniana na drodze dyfuzji przez otoczkę. Szybkość uwalniania substancji czynnej z mikrocząstek i nanocząstek zależy od tempa biodegradacji polimeru, co związane jest z jego budową chemiczną oraz przestrzenną. W technologii mikro- i nanocząstek, obok metody topliwej dyspersji i żelowania, najczęściej wykorzystuje się proces polimeryzacji emulsji. Porównując dostępność biologiczną w okulistycznych postaciach leków obok kropli, emulsji submikronowych oraz mikrocząstek najlepsze parametry uzyskano w przypadku nanocząstek, które tworzą rozproszenia koloidalne [24].



Rycina 1. (A) PAA₄₅₀-CYS insert bezpośrednio po aplikacji
(B) PAA₄₅₀-CYS insert 8 h po aplikacji. Za zgodą Elsevier [16]



Rycina 2. Porównanie wielkości insertu przed nawilżeniem (lewa strona ryciny)
oraz po nawilżeniu (prawa strona ryciny). Za zgodą Elsevier [16]

W postaci mikrosfer do oczu zastosowano m.in. acyklowir, 5-fluorouracyl, metyloprednizon, pilokarpinę, piroksydam. Do nadania postaci mikrosfer wykorzystano chitozan, kwas polimlekowy lub poliglikolomlekowy jak również kwas hialuronowy, albuminy i pektyny [25-31]. Do konstrukcji nanorozproszeń najczęściej stosowanym polimerem był poli-ε-kaprolakton obok innych takich jak: polibutylocyjanoakrylany, izobutylocyjanoakrylany, albuminy oraz chitozan [32-33]. Chitozan został zastosowany w różnych połączeniach w poszczególnych grupach nanorozproszeń takich jak: nanoemulsje, nanokapsułki i nanocząstki, w ten sposób stał się nośnikiem dla wielu substancji leczniczych, m.in. dla: cyklosporyny A, indometacyny, rapamycyny, timololu, metipranololu, carteololu, prednizolonu .

W formie nanoemulsji do terapii okulistycznej została wprowadzona cyklosporyna A. Wydłużenie czasu kontaktu substancji czynnej z rogówką uzyskano również przez aplikację nanozawiesin z hydrokortyzonem, prednizolonem i deksametazonem. Badano wpływ zastosowania mikrosfer żelatynowo-karagenowych na biodostępność tymololu po podaniu do oka. W każdym przypadku zastosowania mikro- i nanocząstek w postaci okulistycznej uzyskano przedłużone działanie substancji czynnej, a tym samym wzrost efektu terapeutycznego [34-37].

1.3.2. Liposomy

W postaci liposomów wprowadzono do oka acyklowir oraz atropinę w formie siarczanu i zasady. Zbadano również liposomowe postacie penicyliny G, chlorowodoru i azotanu pilokarpiny i octanu triamcinolonu. Najlepszą adhezję do rogówki wykazywały liposomy wielowarstwowe (MLV) obdarzone ładunkiem dodatnim. Dzięki wprowadzeniu pilokarpiny do formy liposomowej uzyskano większe obniżenie ciśnienia śródgałkowego niż w przypadku zastosowania wodnych kropli. W okulistyce zastosowano liposomy powlekane 0,05% roztworem carbopolu, co wydłużyło stopień adhezji do rogówki i czas przebywania w przestrzeni przedrogówkowej. W celu wyleczenia opryszczkowego zapalenia rogówki zaproponowano żel liposomowy z inhibitorami DNA [dla wirusa *Herpes simplex* i *Cytomegalovirus*]. Udokumentowano, że niektóre liposomowe postacie do oczu mogą wywoływać podrażnienie. W przypadku dodatnio naładowanych liposomów stwierdzono bolesność w miejscu aplikacji. Żadna postać okulistyczna zawierająca liposomy nie została jak dotąd zarejestrowana jako preparat dostępny na rynku farmaceutycznym [15,38].

1.3.3. Emulsje submikronowe

Emulsje submikronowe to układy o/w, gdzie wielkość rozproszenia fazy olejowej wynosi poniżej 1 μm . Zgodność biologiczną uzyskuje się stosując oleje roślinne i lecytynę jako emulgator. W postaci emulsji submikronowych zastosowano indometacynę, piroksykam i pilokarpinę. W przypadku pilokarpiny - zastosowanie jej w postaci emulsji submikronowych wpłynęło korzystnie na obniżenie ciśnienia śródgałkowego, w porównaniu z roztworem wodnym kropli [39-41].

1.3.4. Mikroemulsje

Dzięki zastosowaniu mikroemulsji w terapii okulistycznej uzyskano wzrost rozpuszczalności składników aktywnych oraz zwiększenie ich dostępności biologicznej i wydłużenie czasu działania. W postaci mikroemulsji zastosowano chloramfenikol, diklofenak sodu, indometacynę [42]. Jako substancje pomocnicze do technologii mikroemulsji z pozytywnym skutkiem włączono poloksamer, triacetynę, glikol propylenowy (mikroemulsje z diklofenakiem i piroksykamem). Stwierdzono 4-krotny wzrost dostępności tymololu przygotowanego w postaci mikroemulsji po zastosowaniu na rogówkę *in vivo*. W postaci żelu mikroemulsyjnego z poloksamerem zastosowano 5-fluorouracyl [43-48].

1.3.5. Liofilizacyjny system do oczu – suche krople do oczu - OLCS

„Suche krople do oczu” stanowią liofilizat, który po zaaplikowaniu do oka ulega oddzieleniu od nośnika. Liofilizat otrzymuje się przez rozpuszczenie substancji leczniczej w roztworze polimeru o właściwościach hydrofilowych, następnie wyjałowienie, liofilizację i osadzenie na hydrofobowym nośniku. W OLCS nie stosuje się środków konserwujących. Jest to dogodna postać dla substancji leczniczych o niskiej rozpuszczalności. Aplikacja OLCS nie stanowi problemu, ponieważ wystarczy dotknąć paskiem polimeru zawierającym substancję czynną o brzeg powieki bez odchylenia głowy do tyłu. Do tej pory w postaci „suchych kropli do oczu” zastosowano pilokarpinę, tropikamid i fluoresceinę [15].

1.3.6. Leki prekursorowe. Promotory wchłaniania

Leki prekursorowe

W lekach prekursorowych aktywność farmakologiczna właściwa dla substancji leczniczej następuje w płynie łzowym po hydrolizie enzymatycznej lub chemicznej. Dzięki zastosowaniu leków prekursorowych w terapii okulistycznej uzyskuje się zwiększenie wchłaniania substancji czynnej, a przy tym poprawę skuteczności działania, co opisano

w przypadku: m.in. deksametazonu, epinefryny, idoksuryny, prednizolonu i tymololu. Zwiększa się stabilność leku jak w przypadku acyklowiru, tymololu i pilokarpiny. Poprawia się także rozpuszczalność oraz zmniejsza działania niepożądane np. stosując prekursor dla 5-fluorouracylu [14].

Promotory wchłaniania

Jako promotory wchłaniania poprawiające dostępność substancji czynnych w lekach okulistycznych stosowane są: EDTA, chlorek benzalkoniowy, heteroglikozydy powierzchniowo czynne oraz sole kwasów żółciowych. Promotory wchłaniania zastosowano w technologii kropli z atenololem, tymololem i betaksololem [49].

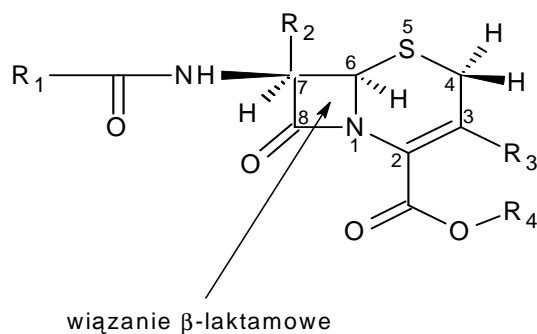
2. Cefalosporyny IV generacji

Cefalosporyny zostały odkryte w 1948 r. przez włoskiego naukowca z Sardynii, Giuseppe Brotzu, który wyizolował z hodowli grzyba *Cephalosporinum acremonium* cefalosporynę C będącą prekursorem tej grupy antybiotyków. Brotzu wywnioskował, że w pobliskiej zatoce muszą żyć mikroorganizmy hamujące namnażanie bakterii jelitowych, co spowodowało brak zachorowań na dur brzuszny, który endemicznie występował na tym terenie wskutek zanieczyszczenia ściekami. W dalszych badaniach Brotzu udowodnił, że filtrat pochodzący z wyhodowanych kultur pleśni zahamował wzrost *Staphylococcus aureus* i po zastosowaniu u chorych powodował wyleczenie z zakażeń gronkowcowych oraz tyfusu. Ponieważ profesor Brotzu nie miał możliwości wyizolowania czystej substancji, dlatego zidentyfikowanie antybiotyku powierzył grupie Floreya. Ostateczne uzyskanie cefalosporyny C przez Abrahama i Newtona nastąpiło w 1953 r. Poszukiwanie nowych antybiotyków cefalosporynowych rozpoczęto od kwasu 7-aminocefalosporanowego. Działając na cefalosporynę C chlorkiem nitrozyłu otrzymano iminolakton, który hydrolizuje do kwasu 7-ACA. Cefepim jako cefalosporyna IV generacji dostępny jest na rynku farmaceutycznym od roku 1997 roku wyłącznie w postaci pozajelitowej [50-54].

2.1. Budowa chemiczna cefalosporyn IV generacji

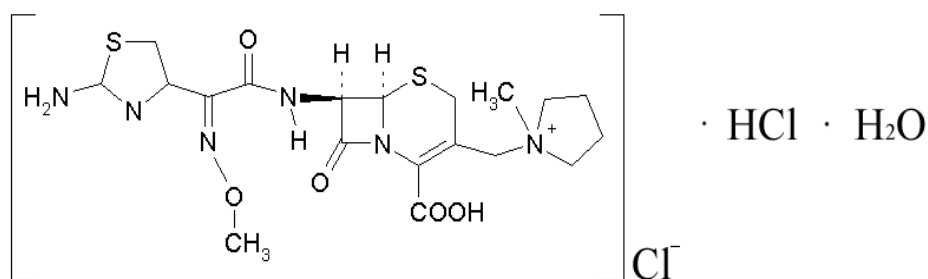
Cefalosporyny posiadają 4 członowy układ β -laktamowy, analogicznie do penicylin, ale w odróżnieniu od tej grupy - mają wbudowany w cząsteczkę sześcioczłonowy układ dihydrotiazyny. Skondensowanie układu β -laktamowego z pierścieniem dihydrotiazyny stanowi układ 2-cefemu, tzw. układ β -laktamowodihydrotiazynowy. Cefalosporyny półsyntetyczne są obszerną grupą antybiotyków, otrzymaną przez dobór odpowiednich podstawników do cząsteczki kwasu 7-aminocefalosporanowego. Modyfikacja chemiczna zwiększa również trwałość układu β -laktamowego, co wpływa na działanie przeciwdrobnoustrojowe. Zależność między strukturą a działaniem cefalosporyn półsyntetycznych zauważyć można przez modyfikację następujących podstawników (Rycina 3.):

- R₁ przy C₇ wpływa na aktywność przeciwbakteryjną, spektrum działania i oporność wobec β -laktamaz bakteryjnych.
- R₂ przy C₇ osłania ugrupowanie β -laktamowe przed rozkładem na skutek działania β -laktamaz.
- R₃ przy C₃ wpływa na farmakokinetykę, trwałość metaboliczną i aktywność.
- R₄ grupy COOH przy C₂ zwiększa lipofilowość oraz dostępność biologiczną.



Rycina 3. Modyfikacje cząsteczki cefalosporyn [50-51, 55]

Ze względu na różnice w aktywności przeciwdrobnoustrojowej, oporności na działanie β -laktamaz, farmakokinetykę i kolejność stosowania w leczeniu, cefalosporyny półsyntetyczne zostały podzielone na 4 generacje. Cefalosporyny IV generacji wykazują analogię w budowie do struktury cefalosporyn III generacji. Do IV generacji cefalosporyn zalicza się obecnie: cefpirom, cefepim, cefozopran, cefoselis i cefklidynę. Istotnym elementem budowy cefalosporyn IV generacji jest IV-rzędowe ugrupowanie amoniowe obdarzone ładunkiem dodatnim w pozycji C₃ oraz ujemnie naładowana grupa COO⁻, dzięki czemu cząsteczka antybiotyku ma charakter jonu obojcnego (tzw. zwitterjon) i łatwiej penetruje przez błony bakteryjne. Dzięki swojej strukturze cefalosporyny IV generacji posiadają dużą aktywność w stosunku do bakterii Gram-ujemnych, wykazują znaczną oporność na działanie β -laktamaz oraz łatwość w przenikaniu do płynu mózgowo-rdzeniowego. Na rycinie 4 przedstawiono strukturę chemiczną cefepimu.



Rycina 4. Struktura chemiczna dichlorowodoru cefepimu

(6R,7R)-7-(((2Z)-(2-aminotiazol-4-ilo)(metoksyimino)acetylo)amino)-3-[(1-metylopirolidynio) metylo]-8-okso-5-tia-1-azobicyklo[4.2.0]okt-2-eno-2-karboksylan, dichlorowodorek jednowodny

Wzór sumaryczny: $C_{19}H_{26}Cl_2N_6O_5S_2$, H_2O ; m.cz. 571,50;

Półsyntetyczny produkt pochodzący z procesu fermentacji;

Zawartość: od 97,0% do 102,0% (w przeliczeniu na bezwodną substancję);

Wygląd: biały lub prawie biały, krystaliczny proszek;

Rozpuszczalność: substancja łatwo rozpuszczalna w wodzie (1:10) i metanolu, praktycznie nie rozpuszczalna w chlorku metylenu [56].

2.2. Mechanizm działania cefalosporyn IV generacji

Cefalosporyny należą do grupy antybiotyków β -laktamowych, stąd mechanizm ich działania polega na hamowaniu syntezy ściany komórkowej, która zbudowana jest z peptydoglikanu. Cefalosporyny unieczynnają enzymy uczestniczące w procesie powstawania muraminy (podjednostki peptydoglikanu). Do enzymów (białek wiążących penicyliny) blokowanych przez cefalosporyny należą transpeptydaza (karboksypeptydaza) i endopeptydaza. Efektem przyłączenia się cefalosporyn do białek wiążących penicyliny jest liza komórki bakteryjnej. Na skutek rozpadu komórki bakteryjnej wzrasta aktywność enzymów autolitycznych, np. hydrolazy muraminy. Inhibitorami tych enzymów są występujące w komórce bakteryjnej: kwas lipotejchojowy oraz lipidy. Związki te blokują dostęp hydrolaz do ściany komórkowej bakterii. Antybiotyki cefalosporynowe hamują inhibitory hydrolaz, co prowadzi do nasilenia procesów autolitycznych zachodzących w komórce drobnoustroju [57-59].

2.3. Cefepim – wpływ właściwości fizykochemicznych na spektrum przeciwdrobnoustrojowe. Zastosowanie w leczeniu

Zgodnie z FPVIII dichlorowodorek cefepimu jednowodny stanowi biały lub prawie biały, krystaliczny proszek, łatwo rozpuszczający się w wodzie i metanolu, ale nierozpuszczalny w chlorku metylenu. Roztwory cefepimu mogą różnić się zabarwieniem i w zależności od stężenia antybiotyku posiadają kolor od bezbarwnego do ciemnobursztynowego. Cefepim znacznie odbiega budową chemiczną od innych cefalosporyn. Antybiotyk posiada niewielką masę cząsteczkową oraz kształt cząsteczki i ładunek, które gwarantują łatwość transportu przez błony biologiczne [52]. Antybiotyk wykazuje powinowactwo do trzech białek wiążących penicyliny takich jak: PBP-3, PBP-1a i PBP-2, dzięki czemu wykazuje aktywność w stosunku do bakterii wytwarzających β -laktamazy typu Amp C (wielooporne szczepy *Enterobacter* i *Citrobacter*) oraz β -laktamazy o poszerzonym spektrum substratowym (ES β L) – wytwarzane m.in. przez niektóre szczepy *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* [60-63]. Cefepim posiada przewagę w stosunku do I, II i III generacji cefalosporyn

ze względu na szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego zarówno na bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne. W porównaniu z cefalosporynami III generacji antybiotyk wykazuje wyższą aktywność przeciwbakteryjną, zwłaszcza wobec szczepów opornych i wytwarzających cefalosporynazy o poszerzonym profilu substratowym. Wykazano, że cefepim jest aktywny wobec szpitalnych zakażeń szczepami *Enterobacter cloacae* z tzw. derepresorowanym genem chromosomalnej cefalosporynazy, które nie mogą być leczone innymi antybiotykami β -laktamowymi z wyjątkiem karbapenemów. Ponadto charakteryzuje się opornością na działanie β -laktamaz plazmidowych i chromosomalnych. Spektrum działania przeciwbakteryjnego antybiotyku przedstawiono w tabeli 1.

Cefepim nie wykazuje aktywności w stosunku do enterokoków, a także gronkowców metycylinopornych (MRSA), ponadto nie działa na pałeczki Gram-dodatnie z gatunku *Listeria monocytogenes* oraz gram-ujemne pałeczki beztlenowe *Bacteroides fragilis*. Nie działa również na *Clostridium difficile*. Antybiotyk nie powinien być stosowany w leczeniu zakażeń spowodowanych przez *Enterococcus faecalis* lub *Enterococcus faecium* oraz *Stenotrophomonas maltophilia* (poprzednia nazwa *Xanthomonas maltophilia* i *Pseudomonas maltophilia*). Cefepim może być nieaktywny wobec penicylioopornych szczepów *Streptococcus pneumoniae*.

Ze względu na szerokie spectrum działania przeciwbakteryjnego wskazania kliniczne do stosowania cefepimu (jako cefalosporyny IV generacji) u dorosłych i dzieci obejmują:

- ciężkie bakteryjne zakażenia dolnych dróg oddechowych (zapalenie płuc, zapalenie oskrzeli) zarówno szpitalne, jak i pozaszpitalne,
- powikłane i niepowikłane bakteryjne zakażenia układu moczowego (z odmiedniczkowym zakażeniem nerek włącznie),
- niepowikłane zakażenia skóry i tkanek miękkich spowodowane przez *Staphylococcus aureus* (szczepy wrażliwe na metycylinę), *Streptococcus pyogenes*,
- empiryczne leczenie gorączki u chorych z neutropenią,
- zakażenia bakteryjne w obrębie jamy brzusznej (również zapalenie otrzewnej, zapalenie dróg żółciowych, infekcje trzustki),
- bakteryjne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (*Neisseria meningitidis*),
- ciężkie zakażenia bakteryjne u pacjentów dializowanych,
- posocznica wywołana przez *Pseudomonas aeruginosa*, pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus* (szczepy wrażliwe na metycylinę) [64-77].

Tabela 1. Spektrum działania przeciwbakteryjnego cefepimu [78-79]

Spektrum działania przeciwbakteryjnego cefepimu obejmuje:
Bakterie Gram- dodatnie:
○ <i>Rodzaj Staphylococcus (S. aureus, S. epidermidis, S. hominis, S. saprophyticus)</i>
○ <i>Rodzaj Streptococcus (S. pyogenes, S. agalactiae, S. pneumoniae, S. bovis)</i>
○ <i>Inne paciorkowce β-hemolizujące</i>
○ <i>Paciorkowce zieleniejące</i>
Bakterie Gram- ujemne:
○ <i>Rodzaj Pseudomonas (P. aeruginosa, P. putida, P. stutzeri)</i>
○ <i>Rodzaj Klebsiella (K. pneumoniae, K. oxytoca, K. ozaenae)</i>
○ <i>Rodzaj Enterobacter (E. cloacae, E. aerogenes, E. sakazakii)</i>
○ <i>Rodzaj Proteus (P. mirabilis, P. vulgaris)</i>
○ <i>Rodzaj Citrobacter (C. diversus, C. freundii)</i>
○ <i>Escherichia coli</i>
○ <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
○ <i>Aeromonas hydrophila</i>
○ <i>Rodzaj Capnocytophaga</i>
○ <i>Campylobacter jejuni</i>
○ <i>Gardnerella vaginalis</i>
○ <i>Rodzaj Haemophilus (H. ducreyi, H. influenzae, H. parainfluenzae)</i>
○ <i>Hafnia alvei</i>
○ <i>Morganella morganii</i>
○ <i>Moraxella catarrhalis</i>
○ <i>Rodzaj Neisseria (N. gonorrhoeae, N. meningitidis)</i>
○ <i>Pantoea agglomerans</i>
○ <i>Rodzaj Providencia (P. rettgeri, P. stuartii)</i>
○ <i>Rodzaj Salmonella</i>
○ <i>Rodzaj Serratia (S. marcescens, S. liquefaciens)</i>
○ <i>Rodzaj Shigella</i>
○ <i>Yersinia enterocolitica</i>
Bakterie beztlenowe:
○ <i>Rodzaj Bacteroides (z wyjątkiem B. fragilis)</i>
○ <i>Rodzaj Fusobacterium</i>
○ <i>Rodzaj Mobiluncus</i>
○ <i>Rodzaj Peptostreptococcus</i>
○ <i>Rodzaj Veillonella</i>
○ <i>Clostridium perfringens</i>
○ <i>Prevotella melaninogenica</i>

2.4. Farmakokinetyka cefepimu

Cefepim może być podawany wyłącznie parenteralnie w postaci iniekcji dożylnych lub domięśniowych. Antybiotyk bardzo dobrze przenika do wszystkich narządów i tkanek osiągając duże stężenia zwłaszcza w moczu, płynie tkankowym, błonie śluzowej oskrzeli, płynie otrzewnowym i pęcherzyku żółciowym. Stężenie cefepimu w płynie ze stanem zapalnym jest dwukrotnie wyższe w porównaniu z płynem bez stanu zapalnego. Z danych dotyczących kinetyki cefepimu wynika, że średni okres półtrwania po dożylnym podaniu antybiotyku wynosi ok. 2 godzin. Nie wykazano kumulacji antybiotyku w organizmie osób otrzymujących dożylnie dawki do 2,0 g co 8 godzin w czasie 9 dni. Całkowity klirens antybiotyku wynosi 120 ml/min i jest zależny od dawki. Średni klirens nerkowy cefepimu osiąga wartość 110 ml/min, co wskazuje na nerki jako główną drogę wydalania antybiotyku. Stężenie antybiotyku po podaniu domięśniowym jest równe połowie stężenia uzyskiwanego w czasie 30-minutowego wlewu dożylnego. Stopień wiązania cefepimu z białkami wynosi ok. 16,4%. Farmakokinetyka cefepimu nie ulega zmianie w przypadku chorych z niewydolnością wątroby. Cefepim w 85% wydalany jest z moczem, z czego około 1% wydalane jest jako N-metylopirolidyna, 6,8% jako N-tlenek N-metylopirolidyny i 2,5% jako epimer cefepimu.

Średni okres półtrwania antybiotyku u pacjentów hemodializowanych z ciężką niewydolnością nerek wynosi 13 godzin, w przypadku pacjentów poddawanych ciągłej ambulatoryjnej dializie otrzewnowej czas ten wydłuża się do 19 godzin. Dostępność biologiczna cefepimu po podaniu domięśniowym u dzieci w wieku od 2 m-cy do 11 lat (dawki pediatryczne 50 mg/kg m.c. co 8 lub co 12 godzin w zależności od rodzaju zakażenia) wynosiła średnio 82%. Nie wykazano zależności właściwości farmakokinetycznych leku od wieku i płci, jedynie u pacjentów w wieku powyżej 65 roku życia zaobserwowano wydłużenie okresu półtrwania i zmniejszony klirens nerkowy. Dostosowanie dawkowania cefepimu zalecane jest jednak tylko w przypadku zaburzenia czynności nerek. Terapia cefepimem trwa 7-10 dni i może ulec wydłużeniu w przypadku bardzo ciężkich infekcji. Wielkość dawkowania i odstępy czasowe w zależności od stanu zakażenia przedstawiono w tabeli 2 [80-84].

Tabela 2. Dawkowanie cefepimu u dorosłych i dzieci powyżej 40kg przy prawidłowej czynności nerek w zależności od stanu zakażenia i drogi podania [60]

Rodzaj zakażenia	Lekkie i umiarkowanie ciężkie zakażenia układu moczowego	Zakażenia lekkie i umiarkowanie ciężkie	Zakażenia ciężkie	Zakażenia bardzo ciężkie i zagrażające życiu
Wielkość pojedynczej dawki i droga podania	0,5-1,0 g i.v. lub i.m.	1,0 g i.v. lub i.m.	2,0 g i.v.	2,0 g i.v.
Częstość podawania	co 12 h	co 12 h	co 12 h	co 8 h

2.5. Działania niepożądane i przeciwwskazania do stosowania cefepimu

Po podaniu pozajelitowym antybiotyku na ogół jest dobrze tolerowany.

- Działania niepożądane związane z podaniem antybiotyku objawiają się najczęściej jako reakcje nadwrażliwości (świąd, wysypka, pokrzywka, duszność, anafilaksja), ponadto mogą występować zaburzenia żołądkowo-jelitowe (nudności, wymioty, biegunka, zaparcia, bóle brzucha, zaburzenia smaku, rzekomobłoniaste zapalenie jelita grubego, niewielkie przemijające zwiększenie aktywności aminotransferaz w osoczu), zaburzenia ze strony OUN (bóle, zawroty głowy, parestezje).
- Działanie niepożądane ze strony układu moczowego to nefrotoksyczność, w tym śródmiąższowe zapalenie nerek.
- Inne problemy związane ze stosowaniem cefepimu to kandydoza jamy ustnej, gorączka polekowa, rozszerzenie naczyń krwionośnych, reakcje miejscowe, w tym rumień, ból w miejscu wstrzyknięcia (podanie domięśniowe) i zapalenie żył (podanie dożylnie) oraz zapalenie pochwy i świąd narządów płciowych.
- Zaburzenia hematologiczne związane z zastosowaniem antybiotyku objawiać mogą się eozynofilią, małopłytkowością, neutropenią i niedokrwistością hemolityczną. Wystąpić może również upośledzona agregacja płytek krwi i zaburzona synteza czynników krzepnięcia zależnych od witaminy K.
- Spożywanie alkoholu podczas terapii cefepimem wywołuje reakcję disulfiramową.
- Stosowanie cefepimu może negatywnie wpływać na wyniki oznaczeń diagnostycznych: glukozy w moczu, aktywności aminotransferazy alaninowej i asparaginianowej oraz alkalicznej fosfatazy. Powoduje wzrost stężenia całkowitej bilirubiny, niedokrwistość, eozynofilię, wydłużenie czasu protrombinowego i tromboplastycznego, dodatni wynik testu Coombs'a bez hemolizy, wzrost stężenia azotu mocznikowego i kreatyniny a także leukopenię, neutropenię, trombocytopenię.

- Antybiotyk jest przeciwwskazany u pacjentów: z nadwrażliwością na cefepim lub którąkolwiek substancję znajdującą się w składzie preparatu, z nadwrażliwością na cefalosporyny, penicyliny i inne antybiotyki β -laktamowe oraz u osób z każdą postacią alergii.
- Podczas leczenia cefepimem może rozwinąć się rzekomobłoniaste zapalenie jelita grubego pod wpływem toksyny nadmiernie namnożonego patogenu *Clostridium difficile*.
- Nie ustalono dotychczas bezpieczeństwa podawania cefepimu kobietom ciężarnym i matkom karmiącym, dlatego cefepim powinien być stosowany w czasie ciąży tylko w przypadku zdecydowanej konieczności (kategoria stosowania leku w ciąży (B)) [60, 85].

W literaturze naukowej w ostatnich latach opisano udokumentowane przypadki encefalopatii po zastosowaniu cefepimu u pacjentów z dysfunkcją nerek. Pierwsze objawy encefalopatii u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek po dożylnym podaniu cefepimu w postaci zaburzeń świadomości oraz drgawek klonicznych mięśni zaobserwowano po około 6 dniach od momentu rozpoczęcia terapii lekiem. Zaburzenia w OUN zostały potwierdzone badaniami EEG wykazującymi u tych pacjentów niekonwulsyjne stany epileptyczne, co doprowadziło do przerwania terapii cefepimem. Przeprowadzone obserwacje kliniczne dowodzą, że leczenie cefepimem pacjentów z niewydolnością nerek może doprowadzić do encefalopatii pomimo dostosowania dawki do stanu pacjenta [86-88]. Yahav i współpracownicy przedstawili dane na temat bezpieczeństwa pozajelitowego stosowania cefepimu w warunkach klinicznych przez 10 ostatnich lat. Wyniki przedstawione w postaci raportu wskazują na występowanie większej śmiertelności u pacjentów leczonych cefepimem (dożylnie lub domięśniowo) w porównaniu z innymi antybiotykami β -laktamowymi. Ustalenie przyczyny i potwierdzenie faktu wyższej śmiertelności wymaga dalszych badań, co aktualnie jest przedmiotem badań FDA we współpracy z producentem leku Bristol-Meyers Squibb [89-90].

2.6. Preparaty handlowe zawierające cefepim

Dostępnym na polskim rynku farmaceutycznym preparatem handlowym zawierającym cefepim jest Maxipime®inj. Preparat Maxipime jest jałową mieszaniną jednowodnego dichlorowodoru cefepimu i L-argininy. L-arginina jest dodawana do preparatu w ilości 0,725 g na każdy gram antybiotyku w celu utrzymania pH gotowych roztworów antybiotyku w granicach 4,0-6,0. Maxipime może być podawany wyłącznie pozajelitowo, w postaci wstrzyknięć dożylnych i domięśniowych. Od lipca 2011 roku dichlorowodorek cefepimu

jest dostępny również w preparacie Cefepime Kabi®inj., który wykazuje taki sam skład jakościowy i ilościowy jak wykorzystany w badaniach Maxipime®inj. (Tabela 3) [60, 91].

Tabela 3. Wielkość dawek preparatu Maxipime® inj. zarejestrowanego w Polsce

Skład proszku	fiolka 500 mg	fiolka 1 g	fiolka 2 g
Jednowodny dichlorowodorek cefepimu (w przeliczeniu na cefepim)	500 mg	1 g	2 g
L-arginina (substancja pomocnicza)	725 mg/g cefepimu		

2.7. Zgodność cefepimu z substancjami leczniczymi i pomocniczymi

W literaturze naukowej zwrócono uwagę na zgodność cefepimu z wieloma substancjami leczniczymi i pomocniczymi stosowanymi w warunkach klinicznych. Dla przykładu cefepim w postaci handlowej do iniekcji (Maxipime inj.) w zakresie stężeń 1- 40 mg/ml jest zgodny z 0,9% roztworem chlorku sodu, z 5% i 10% roztworami glukozy, z roztworem mleczanu sodu do wstrzykiwań, z 5% roztworem glukozy w 0,9% roztworze chlorku sodu, z płynem Ringera z mleczanami w 5% roztworze glukozy. Stwierdzono również zgodność cefepimu po rozpuszczeniu w wodzie z dodatkiem parabenów. Określona przez producenta trwałość roztworów antybiotyku z tymi płynami wynosi 24 h podczas przechowywania w temperaturze pokojowej lub 7 dni w temperaturze 4°C. W tabeli 4 zestawiono zgodność i trwałość roztworów cefepimu z lekami i płynami do wlewów stosowanymi w leczeniu zamkniętym [60].

Niezgodność chemiczną lub fizyczną cefepimu stwierdzono w przypadku połączenia antybiotyku z metronidazolem, wankomycyną, gentamycyną, siarczanem tobramycyny, siarczanem netylmycyny. Ponadto pod względem chemicznym antybiotyk jest niezgodny z erytromycyną, midazolem, aminofiliną i N-acetylocysteiną. Niezgodność fizyczną wykazano również w przypadku połączeń cefepimu z piritramidem, fenytoiną, nikardypiną, dobutaminą (wytrącenie osadu występowało tylko przy dużych stężeniach dobutaminy: 250 mg/ml) [92-93].

Tabela 4. Trwałość i zgodność roztworów Maxipime inj. z innymi lekami i płynami do wlewów

Stężenie cefepimu w przeliczeniu na Maxipime inj.	Dodawany lek i jego stężenie	Płyn do wlewu dożylnego	Okres trwałości roztworu	
			temp. pokojowa	4°C
4,0%	Amikacyna 6 mg/ml	0,9% NaCl lub 5% roztwór glukozy	24 h	7 dni
0,4%	Heparyna 10-50 j./ml		24 h	7 dni
0,4%	Chlorek potasu 10-40 mEq/ml		24 h	7 dni
0,4%-4,0%	Klindamycyna 0,25-6 mg/ml		24 h	7 dni
0,4%	Teofilina 0,8 mg/ml	5% roztwór glukozy	24 h	7 dni
4,0%	Ampicylina 1 mg/ml		8 h	8 h
4,0%	Ampicylina 10 mg/ml		2 h	8 h
4,0%	Ampicylina 1 mg/ml	0,9% NaCl	24 h	48 h
4,0%	Ampicylina 10 mg/ml		8 h	48 h
0,4%	Ampicylina 40 mg/ml		8 h	8 h

2.8. Ocena stabilności cefepimu w roztworach wodnych

Nienaruszone fiołki z cefepimem powinny być przechowywane w temperaturze od 2°C do 25°C i chronione przed światłem. Istnieje możliwość ciemnienia proszku z cefepimem w czasie przechowywania. Zgodnie z deklaracją producenta świeżo przygotowane roztwory wodne cefepimu mogą być bezbarwne lub żółte, co jest zależne od zawartości antybiotyku.

W Farmakopei Polskiej VIII oraz USP 32, jak i w Ph. Eur. 6 nie podano okresu trwałości cefepimu w roztworach wodnych. Przyjmuje się, że antybiotyk można uznać za trwały w danych warunkach badania, jeżeli jego rozkład jest nie wyższy niż 10%.

Wyniki badań dotyczących trwałości cefepimu, przeprowadzonych do tej pory na świecie, wskazują na niestabilność antybiotyku w roztworach wodnych. Udokumentowano, że na szybkość rozkładu cefepimu w roztworach wodnych wpływ ma temperatura, światło, skład rozpuszczalnika, pH, stężenie antybiotyku oraz rodzaj opakowania. Maksimum trwałości antybiotyku występuje przy pH 4,0-6,0. Antybiotyk jest również wyjątkowo wrażliwy na działanie wysokiej temperatury i światła. W roztworach wodnych

w temperaturze pokojowej cefepim jest trwały około 24 godzin, natomiast w temperaturze 4°C jego trwałość wynosi 7 dni. Rozkładowi antybiotyku w podwyższonej temperaturze towarzyszy wzrost pH i zmiana barwy roztworów na bursztynową lub czerwoną. Udokumentowano, że cefepim jest nietrwały w roztworach zasadowych oraz silnie kwasowych. Badania wykazały, że rozkład antybiotyku następuje po 30 minutach w 1 molowym kwasie solnym w temp. 80°C. W czasie 1 minuty antybiotyk rozkłada się w 0,2 molowym roztworze wodorotlenku sodu w temp. 23°C. Vassilis Evangelou i inni dowiedli, że znacznie szybciej cefepim rozkłada się w roztworach zasadowych niż w kwasowych [94-96].

Zmiana barwy roztworów cefepimu odzwierciedla stopień rozkładu antybiotyku. Ciemnienie roztworów podczas przechowywania związane jest z rozkładem antybiotyku. Im wyższe stężenie antybiotyku i im większy jego rozkład, tym barwa roztworu jest ciemniejsza (od bezbarwnego do brunatnego) [97-98].

Ze względu na rozkład cefepimu w roztworach wodnych w trakcie ich przechowywania, udowodniono, że nie ma możliwości podania cefepimu w 5-12% roztworach w ciągłym wlewie dożylnym przy temperaturze otoczenia 20-37°C. Trwałość (>95%) cefepimu w badanych roztworach wyniosła 24 godziny w temperaturze 25°C, 14 godzin w temperaturze 30°C i około 10 godzin w temperaturze 37°C. Więcej niż 10% antybiotyku uległo rozkładowi podczas przechowywania badanych roztworów przez ponad 12 godzin w temperaturze 37°C. Udokumentowano również wyraźny wzrost pH oraz pojawienie się czerwono-fioletowego zabarwienia badanych roztworów z cefepimem [99].

Trwałość 10% i 20% roztworów cefepimu w 5% glukozy, 0,9% roztworze NaCl oraz w jałowej wodzie do wstrzykiwań zbadano podczas przechowywania w trzech różnych warunkach temperaturowych. Stabilność antybiotyku w 5% dekstrozy, 0,9% NaCl i wodzie do wstrzykiwań określona zgodnie z warunkami przechowywania wyniosła: 90 dni w temperaturze -20°C; 7 dni w temperaturze 4°C oraz 1 dzień w temperaturze 22-24°C [100].

Dla porównania przeprowadzono badanie trwałości cefepimu w stężeniu 0,8% w 5% roztworze glukozy i w 0,9% NaCl. Roztwory cefepimu, zamknięte w pojemnikach z polietylenu przechowywano w temp. 24±2°C przy dostępie światła oraz w temperaturze 4±2°C w miejscu bez dostępu światła. Stabilność roztworów cefepimu, niezależnie od rozpuszczalnika, przechowywanych w temperaturze 4°C wyniosła 15 dni. W temperaturze 24±2°C w roztworze 0,9% NaCl cefepim był stabilny przez 72 godziny, a w roztworze 5% glukozy przez 48 godzin [101].

2.9. Przegląd wybranych metod instrumentalnych, zastosowanych do identyfikacji jakościowej i ilościowej cefepimu w matrycach różnego pochodzenia

W tabeli 5 przedstawiono przegląd metod zastosowanych do analizy jakościowej i ilościowej cefepimu w postaciach farmaceutycznych oraz w różnych matrycach biologicznych.

Tabela 5. Wybrane metody instrumentalne do identyfikacji jakościowej i ilościowej cefepimu w matrycach różnego pochodzenia [102]

Metoda	Metoda wg USP 32 - metoda HPLC, chromatografia par jonowych
Faza stacjonarna	Kolumna C18 (300 mm x 3,9 mm)
Faza ruchoma	5,76 g soli sodowej kwasu pentanosulfonowego rozpuszczono w 2000 ml wody. Doprowadzono do pH 3,4 za pomocą lodowatego kwasu octowego, a następnie do pH 4,0 za pomocą roztworu KOH. Gotowy roztwór połączono z acetonitrylem (94:6) i odgazowano za pomocą ultradźwięków.
Detektor	Detektor UV-VIS długość fali 254 nm
Czas retencji (min)	Brak danych wg Farmakopei Amerykańskiej
Parametry analizy	Przepływ fazy ruchomej 2 ml/min, współczynnik ogonowania (TF) nie więcej niż 1,7, ilość pól teoretycznych (N) nie mniej niż 1500
Literatura	[103,104]
Metoda	Oznaczanie cefepimu i metronidazolu w roztworze wodnym - chromatografia par jonowych
Faza stacjonarna	Kolumna fenylowa (100 mm x 4,6 mm, ziarno 5 µm)
Faza ruchoma	Sól sodową kwasu 1-pentanosulfonowego rozpuszczono w wodzie do stężenia 0,015 M/l. Gotowy roztwór doprowadzono do pH 3,4 za pomocą lodowatego kwasu octowego i następnie do pH 4,0 za pomocą 45% roztworu KOH. Przygotowany rozpuszczalnik połączono z acetonitrylem w stosunku 94,5:5,5 (v/v).
Detektor	Detektor UV-Vis dł. fali 280 nm
Czas retencji (min)	$t_R = 6,9$ min dla cefepimu, $t_R = 2,3$ min dla metronidazolu
Parametry analizy	Przepływ fazy ruchomej 1,5 ml/min. Parametry uzyskane: LOD=63 ng/ml i 125 ng /ml odpowiednio dla metronidazolu i cefepimu; współczynnik retencji $k=6,2$; ilość pól teoretycznych $N=1947$, $T_F=1,38$, $R_S=9,39$
Literatura	[103,105]
Metoda	Oznaczanie cefepimu i grapefloksacyny w moczu pacjentów z bakteryjnym zakażeniem dróg moczowych - metoda HPLC w gradiencie.
Faza stacjonarna	Kolumna C18 (250 mm x 4 mm) LichroCart
Faza ruchoma	Acetonitryl: 0,1M bufor fosforanowy o pH 3 : 0,01M roztwór n-oktyloaminy. Stosunek rozpuszczalników zmienny w czasie analizy: 8:46:46 (6 min) 36:32:32 (6 min) Najkorzystniejsze parametry rozdzielania uzyskano przy stosunku wagowym rozpuszczalników wynoszącym 8:46:46 (2 min)
Detektor	Detektor diodowy (DAD), dł. fali 259 nm dla cefepimu, 278 nm dla grapefloksacyny

<i>c.d. Tabeli 5.</i>	$t_R = 4,03$ min dla cefepimu $t_R = 8,85$ min dla grapeflokscyny
Czas retencji (min)	
Parametry analizy	Przepływ fazy ruchomej 0,5 – 2,0 ml/min , optymalny przepływ 1,3 ml/min LOD=1,0 µg/ml; LOQ=3,3 µg/ml; Rs=2,31 dla cefepimu
Literatura	[103,106]
Metoda	Oznaczanie cefepimu, wankomycyny i imipenemu u pacjentów z rozległymi oparzeniami - metoda HPLC
Faza stacjonarna	Kolumna Supelcosil LC 18 (250 mm x 4,6 mm)
Faza ruchoma	0,075 M bufor octanowy o pH 5 i acetonitryl w stosunku 92:8 (v/v)
Detektor	Detektor UV długość fali 230 nm
Czas retencji (min)	$t_R = 9,3$ min dla cefepimu, $t_R = 17,4$ min dla wankomycyny, $t_R = 22,7$ min dla imipenemu
Parametry analizy	Szybkość przepływu fazy ruchomej: 0,8 ml/min LOD= 0,4 µg/ml LOQ= 0,8 µg/ml
Literatura	[103,107]
Metoda	Oznaczanie cefepimu i cefazoliny w osoczu i dializacie pacjentów z niewydolnością nerek poddawanych dializie otrzewnowej i hemodializie - metoda HPLC w gradiencie
Faza stacjonarna	Kolumna monolityczna C18 (200 mm x 4,6 mm) Onyx Phenomenex
Faza ruchoma	Metanol: 10mM bufor fosforanowy o pH 7 Stosunek rozpuszczalników zmienny w czasie analizy: 20:80 (3 min) 90:10 (6 min) 20:80 (7 min)
Detektor	Detektor UV-Vis długość fali 254 nm
Czas retencji (min)	$t_R = 3,4$ min dla cefepimu $t_R = 5,8$ min dla cefazoliny
Parametry analizy	Przepływ fazy ruchomej 1,0 ml/min; LOD=1,0 µg/ml (dla cefepimu i cefazoliny)
Literatura	[103,108]
Metoda	Oznaczanie trwałości cefepimu w roztworach do wlewu dożylnego-metoda HPLC
Faza stacjonarna	Kolumna Lichrocart 100 RP-18 (125 mm × 4 mm)
Faza ruchoma	Bufor octanowy (pH 4,8) i acetonitryl w stosunku 90:10 (v:v)
Detektor	Detektor diodowy (DAD), dł. fali 257 nm
Czas retencji (min)	$t_R = 2,7$ min
Parametry analizy	Przepływ fazy ruchomej: 1,0 ml/min LOD= 0,1 µg/ml LOQ= 1,0 µg/ml
Literatura	[101,103]

c.d. Tabeli 5.	Oznaczenie cefepimu w osoczu, płynie mózgowo-rdzeniowym i moczu – metoda HPLC
Metoda	
Faza stacjonarna	Kolumna LiChropher 100 -RP18 (250 mm x 4,0 mm)
Faza ruchoma	10mM bufor fosforanowy (pH 7) i metanol w stosunku 75:25 (v/v)
Detektor	Detektor diodowy (DAD), długość fali 256 nm
Czas retencji (min)	$t_R = 2,8$ min
Parametry analizy	Przepływ fazy ruchomej: 1 ml/min – do oznaczania cefepimu w osoczu i moczu, 0,5 ml/min – do oznaczania cefepimu w płynie mózgowo-rdzeniowym Rozdzielczość $R_s > 2,0$
Literatura	[103,109]
Metoda	Oznaczenie cefepimu i L-argininy w preparacie do iniekcji Maxipime - spektrofotometria drugiej pochodnej
Aparatura	Spektrofotometr UV Kuweta kwarcowa 1 cm, Próbki do analiz rozpuszczono w wodzie destylowanej
Parametry pomiaru	Szerokość szczeliny 2 nm Szybkość skanowania 45nm/min
Długość fali	Długość fali 201 nm dla l-argininy Dwie długości fal dla cefepimu 239 nm i 254 nm Prawo Lamberta- Beera zostało spełnione dla stężenia powyżej 50 µg/ml dla cefepimu i 22 µg/ml dla L- argininy.
Literatura	[110,111]
Metoda	Oznaczenie cefepimu i L-argininy w preparacie do iniekcji Maxipime - strefowa elektroforeza kapilarna (CZE)
Aparatura	Aparat do elektroforezy kapilarnej Kapilara silikonowa (50 µm x 64,5 cm) Temp. kapilary 30°C Napięcie przyłożone na kapilarę 30 kV Detektor Diodowy (DAD), długość fali 195 nm Bufor do analizy 40mM bufor diwodorofosforan sodu doprowadzony kwasem fosforowym do pH 2,3. Wzorzec wewnętrzny: l-histydyna.
Parametry pomiaru	LOQ= 3,0 µg/ml dla l-argininy, LOQ= 6,0 µg/ml dla cefepimu LOD= 1 µg/ml dla cefepimu, LOD =2 µg/ml dla l-argininy Czas migracji: Dla cefepimu :10,27-11,48 min Dla l-argininy 5,21-5,46 min
Literatura	[110,112]

<i>c.d. Tabeli 5</i>	Oznaczenie cefepimu oraz substancji pochodnych- metoda HPLC w gradiencie
Metoda	
Faza stacjonarna	Kolumna Acclaim 120C RP18 (250 mm x 2,1mm, ziarno 3µm)
Faza ruchoma	A:CH ₃ CN:5mMKH ₂ PO ₄ (pH =5,0) 6:94 B: CH ₃ CN:5mMKH ₂ PO ₄ (pH =5,0) 50:50
Detektor	Detektor UV-ViS dł. fali 254 nm
Czas retencji (min)	t _R =6,95 min dla cefepimu, t _R =9,39 min: zanieczyszczenie F wg Ph. Eur. t _R =15,0 min: zanieczyszczenie A, t _R =15,0 min: zanieczyszczenie B
Parametry analizy	Przepływ fazy ruchomej: 0,2 ml/min, Rozdzielczość Rs > 2,0 Współczynnik ogonowania - T _f nie mniej niż 1,7 dla cefepimu Pólki teoretyczne: N nie mniej niż 1500 dla cefepimu
Literatura	[103,113]

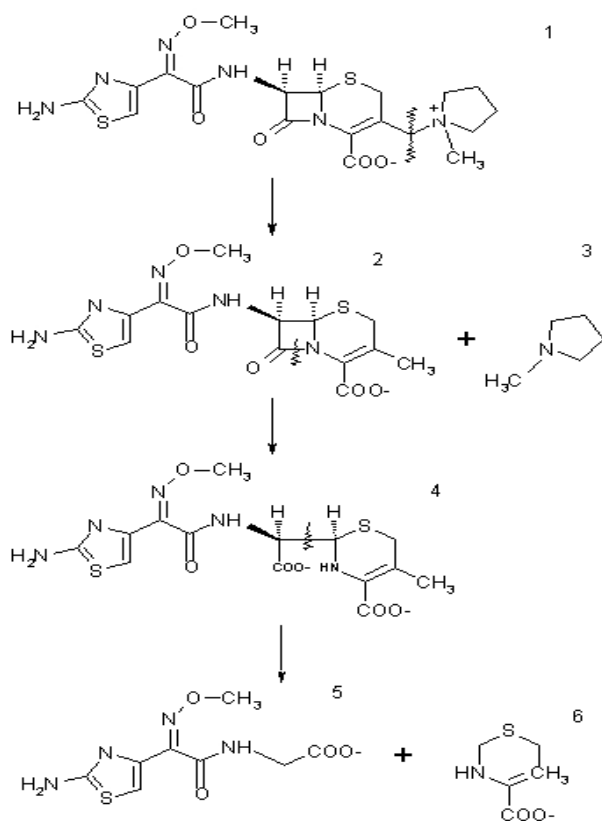
W monografii: „*Cefepimi Dihydrochloridum Monohydricum*” zawartej w FPVIII nie przytoczono metody HPLC do oznaczania zawartości cefepimu. Wyżej wymieniona monografia zawiera metodę do oceny tożsamości antybiotyku (spektrofotometria w podczerwieni) oraz metodę HPLC do analizy zanieczyszczeń, w tym N-metylopirolidyny [56].

3.0. Produkty rozkładu cefepimu

3.1. Dotychczasowy stan badań nad produktami rozkładu cefepimu

Badania nad trwałością cefepimu, prowadzone wcześniej, potwierdzają, że szybkość rozkładu cefepimu zależy od temperatury. Ekspozycja na światło również przyspiesza ten proces. Podczas przechowywania roztworów cefepimu następuje zmiana ich zabarwienia. Początkowo bezbarwne lub lekko żółte roztwory zmieniają kolor na żółty, bursztynowy, a w wyższych stężeniach nawet na czerwony i brązowy. Rozkładowi cefepimu towarzyszy zmiana odczynu jego roztworów. Badania wykazały, że zmiana pH roztworów cefepimu jest zależna od temperatury (podobnie jak szybkość rozkładu antybiotyku). Ponadto produkty rozkładu o charakterze zasadowym, przyczyniając się do wzrostu pH, przyspieszają proces degradacji cefepimu. Mechanizm rozkładu cefepimu w środowisku wodnym opiera się na reakcji hydrolizy, aminolizy, alkoholizy, a przypadku ekspozycji na światło - fotolizy. Prawdopodobny rozkład cefepimu w roztworze glukozy został określony przez Sprautena i wsp. metodą spektrometrii mas. Rozkład cefepimu rozpoczyna się odłączeniem cząsteczki N-metylopirolidyny w pozycji R2 oraz otwarciem pierścienia β-laktamowego. Otwarcie pierścienia cefemu powoduje powstanie dwóch kolejnych produktów rozpadu, jeden z nich został zidentyfikowany jako: 2-(((2-amino-4-tiazolilo) (metoksyimino) acetylo)amino]

acetaldehyd. Schemat rozkładu cefepimu w roztworze glukozy przedstawiono na rycinie 5 [114-115].



Rycina 5. Schemat degradacji cefepimu w roztworze glukozy

- 1 - cefepim
- 2 - przejściowy produkt rozpadu powstający przez otwarcie pierścienia β -laktamowego po odłączeniu się cząsteczki N-metylopirolidyny (NMP)
- 3 - N-metylopirolidyna
- 4 - przejściowy produkt rozpadu przed otwarciem pierścienia cefemu
- 5 - główny produkt rozkładu: 2-(((2-amino-4-tiazolilo)(metoksyimino)acetylo)amino]acetaldehyd
- 6 - produkt rozkładu cefepimu powstający po otwarciu pierścienia cefemu

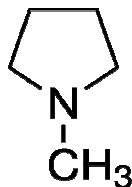
3.2. N-metylopirolidyna jako główny produkt rozkładu cefepimu

Zawartość N-metylopirolidyny (NMP) wpływa na czystość jego roztworów. NMP znajdująca się w preparacie cefepimu do wstrzykiwań może być toksyczna. W Farmakopei Amerykańskiej (USP 32) określono limit NMP, której zawartość nie może przekroczyć więcej niż 1% w preparacie do iniekcji i nie więcej niż 0,3% w samym chlorowodoru cefepimu. Według Farmakopei Polskiej VIII poziom zanieczyszczenia N-metylopirolidyną

w chlorowodoru cefepimu nie powinien przekroczyć 0,5%. Nie określono tu limitu zanieczyszczenia NMP w preparacie do iniekcji. N-metylopirolidyna jest bezbarwną, łatwo palną cieczą o charakterystycznym (bardzo nieprzyjemnym) aminowym zapachu. Roztwory wodne NMP w stężeniu 0,1% posiadają pH = 11,3 (Rycina 6) [56, 104]. Toksyczność N-metylopirolidyny określona w karcie charakterystyki zawiera następujące dane [116]:

1. LD₅₀ dla szczura po podaniu doustnym wynosi 280 mg/kg m. c.
2. Kontakt z drogami oddechowymi powoduje podrażnienie błon śluzowych, kaszel, duszności oraz absorpcję substancji.
3. Kontakt ze skórą powoduje oparzenia i trudno gojące się rany.
4. Bezpośredni kontakt z oczami powoduje oparzenia i stwarza ryzyko oślepienia.
5. Spożycie substancji powoduje poparzenie jamy ustnej, gardła, przełyku oraz dalszych odcinków przewodu pokarmowego. Istnieje nawet ryzyko perforacji przełyku oraz żołądka.
6. Ponadto NMP wywiera działania ogólnoustrojowe takie jak: mdłości, zawroty głowy, wymioty, biegunka.
7. Zmieszanie N-metylopirolidyny z azotynami lub kwasem azotowym skutkuje powstaniem rakotwórczych nitrozoamin (udowodniono w badaniach na zwierzętach).

W badaniach na małpach wykazano, że podawanie N-metylopirolidyny w dawce wynoszącej 50 mg/kg m.c. przez okres 30 dni powodowało wystąpienie ataksji oraz zezą podczas eksperymentu i po jego zakończeniu. Dobowa dawka eksperymentalna podawana małpom była 25 razy większa niż zawartość N-metylopirolidyny uwalniana podczas leczenia cefepimem w dawce 6,0 g na dobę, zakładając, że antybiotyk uległ 10% rozkładowi. Zastosowanie niższych dawek NMP w przebiegu eksperymentu nie spowodowało wystąpienia żadnych znaczących objawów [93].



Rycina 6. N-metylopirolidyna - struktura chemiczna [116]

Lipofilowy charakter cząsteczki N-metylopirolidyny powoduje, że szybko penetruje do tkanek organizmu. W badaniach na szczurach zastosowano znakowaną węglem

radioaktywnym ^{14}C N-metylopirolidynę, której stężenie w ciągu kilku minut po iniekcji dożylniej w wybranych tkankach (płuca, serce, wątroba, czerwone krwinki, mózg) było prawie takie samo lub wyższe niż w osoczu. W czasie 24 godzin aż 72-96% dawki cefepimu znakowanego węglem ^{14}C zostało wykryte w moczu, z czego 86% występowało w postaci niezmienionej, a 12% jako N-tlenek N-metylopirolidyny i 2% jako czysta N-metylopirolidyna. W badaniach *in vitro* w obecności enzymów mikrosomalnych komórek wątroby szczura wykazano, że w czasie 1h 2/3 zawartości N-metylopirolidyny zostało przekształcone w N-tlenek N – metylopirolidyny [117-118].

3.3. Oznaczanie N-metylopirolidyny w postaciach leków z cefepimem

N-metylopirolidyna zapewnia cefepimowi bardzo dobrą penetrację do wnętrza komórki bakteryjnej, ale również stanowi jeden z głównych produktów rozkładu antybiotyku, o udokumentowanym niekorzystnym wpływie na organizm ludzki.

W Farmakopei Amerykańskiej (USP 32) i w Farmakopei Polskiej VIII zaproponowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej do oznaczania N-metylopirolidyny w postaciach leku zawierających cefepim.

Metoda oznaczania NMP wg USP 32 polega na zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją konduktometryczną. Eluent stanowi mieszanina 0,01M kwasu azotowego z acetonitrylem w stosunku 100:1, szybkość przepływu wynosi: 1 ml/min. Rozdziału chromatograficznego dokonuje się na kolumnie jonowymiennej (6 mm × 5 cm, ziarno 5 μm, L52 – zgodnie z oznaczeniem USP 32). Roztwór badany przygotowuje się przez rozpuszczenie 0,1g cefepimu w 10 ml 0,01M kwasu azotowego. Roztwór wzorcowy przygotowuje się przez rozcieńczenie 0,16 ml NMP wodą do 100 ml. Do 4 ml otrzymanego roztworu dodaje się 96 ml 0,01M kwasu azotowego. Oba roztwory nastrzykuje się na kolumnę w objętości 100 μl. [104].

Farmakopea Polska VIII do oznaczania zawartości N-metylopirolidyny przytacza, analogicznie jak w USP 32, metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją konduktometryczną wraz z identycznymi parametrami analizy oraz fazą ruchomą i stacjonarną. Sposoby przygotowania roztworu badanego i wzorcowego również nie odbiegają od tych zaproponowanych w USP 32. Różnica polega tylko na wyższej zawartości NMP w roztworze wzorcowym (0,25% wg FPVIII) oraz na włączeniu do analizy roztworu wzorcowego b, w którym znajduje się pirolidyna. Roztwory wzorcowe łączy się ze sobą (5ml:5ml) i nastrzykuje na kolumnę [56].

Podana metoda HPLC z detekcją konduktometryczną została opisana również w Farmakopei Japońskiej, przy czym zmodyfikowano tam skład ilościowy fazy ruchomej, ponieważ 0,01M kwas azotowy i acetonitryl miesza się w stosunku 99:1. Opisaną w literaturze naukowej wadą metody farmakopealnej przeznaczonej do oznaczania NMP jest przede wszystkim zbyt długi czas analizy jednej próbki oraz duża zmienność czasu retencji dla NMP. Wskazano również na niestabilność cefepimu w roztworze o wartości pH = 2. Dlatego jako alternatywę zaproponowano oznaczanie NMP w preparatach cefepimu metodą chromatografii gazowej. Zgodnie z zaleceniami do analizy NMP metodą GC przygotowano 2% roztwór cefepimu w chloroformie po wcześniejszym zmikronizowaniu antybiotyku w mózdzierzu, dodaniu 1ml roztworu wzorca wewnętrznego (0,5 ml pirydyny/1000 ml chloroformu) i rozcieńczeniu w kolbie miarowej do wymaganej objętości. Fazę stacjonarną stanowiła kolumna polidimetylosiloksanowa (grubość filmu 5 μm) o wymiarach 60 m x 0,53 mm. Prędkość gazu nośnego przy zalecanej temperaturze kolumny 100°C i układu oraz detektora 250°C wynosiła: azot 40 ml/min, wodór 4 ml/min, powietrze 100 ml/min. Detekcję przeprowadzono z użyciem detektora płomieniowo - jonizacyjnego (FID). Objętość próbki do nastrzyku wynosiła 1 μL . W zastosowanej metodzie uzyskana wartość granicy wykrywalności i granicy oznaczalności dla NMP wyniosły odpowiednio: 0,3 $\mu\text{g/ml}$ i 1,12 $\mu\text{g/ml}$. Zaletą zastosowanej metody GC jest wyższa czułość, mniejsza czasochłonność oraz większa stabilność czasu retencji [119].

Do oznaczania pochodnych pirolidonu (m.in. N-metylopirolidyny) zaproponowano również z dobrym skutkiem metodę mikroekstarkcji do fazy stałej w połączeniu z chromatografią gazową (HS/SPME-GC/NPD, *Headspace solid phase microextraction and gas chromatography-nitrogen-phosphorous detection*) [120].

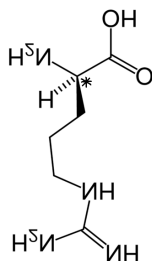
Metoda elektroforezy kapilarnej z detekcją UV okazała się przydatna do oznaczenia zawartości N-metylopirolidyny w preparatach do iniekcji zawierających cefepim. Rozdzielenie składników preparatu, tj. cefepimu, L-argininy oraz N-metylopirolidyny dokonano w termostатовanej (25°C) kapilarze silikonowej (50 μm x 64,5 cm, długość drogi detekcji = 56 cm). Jako bufor zastosowano 10 mM roztwór kreatyniny doprowadzony do pH 3,8 za pomocą kwasu mrówkowego, przy stałym napięciu wynoszącym 30kV i długości fali detektora równej 225 nm. Oznaczona zawartość NMP w próbce cefepimu mieściła się w granicach 0,1-2,0% [121].

Oznaczenie ilościowe NMP w cefepimie dokonano metodą HPLC w gradiencie ze zmodyfikowaną detekcją konduktometryczną (CSRS 300-2mm, recycle mode, 100mA). W badaniach zastosowano kolumnę (CS 17,2 x 250 mm) z prekolumną IonPac

(CG 17,2 x 50 mm), którą termostatowano do temp.40°C przy przepływie fazy ruchomej 0,40 ml/min. Uzyskane stężenie NMP na podstawie analizy trzech niezależnych prób wynosiło 0,236±0,003% [122].

4.0 L-arginina jako składnik handlowej postaci leku z cefepimem

L-arginina jest dodawana do chlorowodoru cefepimu celem doprowadzenia preparatu do wartości pH wynoszących od 4,0 do 6,0. Na każde 1,0 g chlorowodoru cefepimu dodane zostało 0,725 g L-argininy. Dzięki takiemu połączeniu antybiotyk może być wprowadzony do ustroju drogą dożylną lub domięśniową (Rycina 7).



Rycina 7. Struktura L-argininy

Zgodnie z danymi zawartymi w FPVIII, Ph.Eur.6. i USP 32 pod względem fizykochemicznym L-arginina stanowi biały, krystaliczny proszek lub bezbarwne kryształy. Substancja łatwo rozpuszcza się w wodzie, natomiast bardzo trudno w etanolu, praktycznie wcale nie rozpuszcza się w eterze. L-arginina nie jest higroskopijna. Poddana suszeniu w temperaturze 105°C w czasie 3 godzin traci nie więcej niż 0,5% masy. Roztwory wodne L-argininy wykazują pH silnie alkaliczne [123-124]. Sole L-argininy, takie jak chlorowodorek, asparginian, cytrynian i glutaminian są bezpośrednio wykorzystywane w leczeniu. Arginina w postaci proszku wykazuje dobrą trwałość i odporność na czynniki środowiskowe natomiast musi być chroniona przed światłem. W wysokiej temperaturze, np. podczas ogrzewania L-arginina nie ulegając polimeryzacji rozkłada się do tlenku węgla, dwutlenku węgla, tlenku azotu i chlorowodoru [125-130].

III. Cel pracy

1. Opracowanie technologii 1% i 5% w/w recepturowych kropli do oczu z cefepimem i określenie trwałości kropli przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C poprzez wyznaczenie czasu (dni), w którym stężenie cefepimu w kroplach będzie utrzymywało się na poziomie nie niższym niż 90% początkowego stężenia.
2. Opracowanie i walidacja metody HPLC do ilościowego oznaczania cefepimu w 1% i 5% recepturowych i „przemysłowych” kroplach do oczu świeżo sporządzonych oraz w czasie ich przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C.
3. Ocena wpływu niezbędnych w składzie kropli substancji pomocniczych (rozpuszczalników, substancji buforujących, substancji zwiększającej lepkość, substancji konserwujących), temperatury przechowywania oraz stężenia cefepimu na właściwości fizyczne oraz trwałość cefepimu w 1 % i 5 % kroplach recepturowych.
4. Opracowanie składu i metody sporządzania rozpuszczalników przeznaczonych do 1 % i 5% „przemysłowych” kropli z cefepimem z określeniem ich trwałości testem przyspieszonego starzenia i testem długoterminowym zgodnie z wytycznymi ICH oraz badaniami skuteczności przeciwdrobnoustrojowej środków konserwujących w rozpuszczalnikach z ich zawartością.
5. Ocena trwałości cefepimu w 1% i 5% kroplach do oczu w wersjach „przemysłowych” sporządzonych z zastosowaniem rozpuszczalników świeżo sporządzonych oraz poddanych badaniom trwałości testem przyspieszonego starzenia wg ICH.

IV. Część doświadczalna

1. Materiał do badań

- 1% i 5% w/w recepturowe krople do oczu z cefepimem.
- Roztwory substancji pomocniczych zastosowane w 1% i 5% w/w kroplach z cefepimem w wersjach recepturowych (bufory cytrynianowe, roztwory alkoholu poliwinylowego, 0,04% roztwór boranu fenylortęciowego).
- Rozpuszczalniki przeznaczone dla 1% i 5% kropli „przemysłowych” świeżo sporządzone, poddane testowi przyspieszonego starzenia (6 miesięcy, w temperaturze $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i RH $75\% \pm 5\%$) oraz poddane badaniom stabilności testem długoterminowym (12 m-cy w temperaturze $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i RH $60\% \pm 5\%$).
- 1% i 5% „przemysłowe” krople do oczu z cefepimem sporządzone na świeżo przygotowanych rozpuszczalnikach oraz na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej testowi przyspieszonego starzenia przez 6 miesięcy w temperaturze $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i RH $75\% \pm 5\%$.

2. Substancje pomocnicze i odczynniki użyte do badań

Tabela 6. Odczynniki i substancje pomocnicze zastosowane do badań

Nazwa substancji pomocniczej lub odczynnika	Nr serii i producent
Maxipime@inj. fiołki-proszek do sporządzania wstrzyknięć dożylnych i domięśniowych zawierający w fiołce 1 g chlorowodoru cefepimu i 0,725 g L-argininy.	Serie: 6017385, 8E37309, 6F17413, 7D21469. Bristol-Myers Squibb
Chlorowodorek cefepimu – wzorzec wg USP 301097636	GOD116., WCG Standards UK. Dystrybutor: Promochem, Polska,
L-arginina	1261773, 21206077, Fluka Biochemika
Kwas cytrynowy 1.hydrat cz.d.a	0562 09 06, POCH S.A. Gliwice
Cytrynian sodu FPVI cz.d.a	0713 07 05, POCH S.A. Gliwice
Alkohol poliwinylowy (PVA) m.cz. 72000 cz.d.a	734892424, POCH S.A., Gliwice
Alkohol β-feniloetylowy cz.d.a	017K0670, Sigma-Aldrich, Niemcy
Boran fenylortęciowy	S366137, Sigma-Aldrich, Niemcy
Chlorek benzalkoniowy	190158, MP, Biomedicals, INC
Diocetan chlorheksydyny	41930065, Caelo Caesar and Loretz GmbH, Germany
Tiomersal	41617.147, Caelo Caesar and Loretz GmbH, Germany
Kwas 1-pentanosulfonowy, sól sodowa do chromatografii jonowo-asocjacyjnej (czystość do HPLC)	K 37614504 802 Merck KGaA, Germany
Wodorotlenek potasu (czystość do HPLC)	0725701019 J.T. Baker, Holland
Kwas octowy lodowaty (czystość do HPLC)	0705205009 J.T. Baker, Holland
Acetonitryl (czystość do HPLC)	0822/02/09 POCH S.A., Gliwice
Metanol (czystość do HPLC)	0731012026 J.T. Baker, Holland
Uracyl (czystość do HPLC)	130614321407039 Fluka, Germany
Woda do HPLC o przewodności do 0,05 μS (25°C)	Aparat System Synergy Millipore, Francja
Bufor Hamilton Durcal, pH 4,01±0,02	1312829, Hamilton, Bonaduz A6, Szwajcaria,
Bufor Hamilton Durcal, pH 7,00±0,02	1314185, Hamilton, Bonaduz A6, Szwajcaria,

3. Sprzęt i aparatura

Tabela 7. Aparatura i sprzęt użyty do badań

Nazwa sprzętu lub aparatury	Producent i parametry sprzętu lub aparatury
<p>Zestaw do wysokosprawnej chromatografii ciekowej HPLC Shimadzu</p> <p>Moduły:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Automatyczny podajnik próbek z chłodzeniem (SIL-20A/20AC) • Piec do kolumn z chłodzeniem (CTO-20A/20AC) • Pompa dwutłokowa do gradientu wysoko- i niskociśnieniowego (LC-20AD) • Detektor diodowy (SPD-M20A) • Degazer (DGU-20A5) • Mieszalnik • Oprogramowanie LC-Solution do sterowania zestawem 	Shimadzu Corporation Japonia
Kolumna Gemini 250 x 4,6 mm, ziarno 5 µm, porowatość 110 Å	Phenomenex
Spektrofotomet UV-VIS V-530	Jasco Tokio
Waga precyzyjna 3 kg	WPT 3C Radwag, Polska
Waga precyzyjna 720 g	WPS 720/C/2 Radwag, Polska
Waga proszkowa	WPS 110/C/2 Radwag, Polska
Waga analityczna Sartorius Expert	Max 220g, d=0,01mg LE 225 D Niemcy
pH-metr	CP-502 Elmetron, Polska
Elektroda pH-metryczna	SienTix 22, Niemcy
Osmometr	800 cl 497 Trident Med.S.C. Polska
Wiskozymetr Höpplera	KF-10 Medington, Niemcy
Gęstościomierz DENSITO	n 30PX Mettler Toledo, Szwajcaria
Mikropipeta LM-100	100µl, LabMate Błąd dokładności ±0,8%, PZ HTL S.A. Warszawa

Mikropipeta LM-1000	100-1000µl, LabMate Błąd dokładności ±0,6%, PZ HTL S.A. Warszawa
Płyta grzewcza	Ø 8 cm SGK-1 Conbest Polska
Łaźnia wodna dwustanowiskowa	MLL 147 AJL Electronict Kraków
Zestaw do sączenia mikrobiologicznego Sartorius z butlą Woulffa 500ml	Pompa 16692/16695 Niemcy
Aparat do otrzymywania wody do HPLC	System Synergy®UV Millipore Corporation Francja
Sterylizator na suche gorące powietrze	SP-65W Wamed Polska
Suszarka laboratoryjna	SUP-100M Wamed Polska
Chłodziarka farmaceutyczna	Zakres temperatur 2°C-20°C MED-288 Philipp Kirsch Niemcy
Laboratoryjny sterylizator parowy	AS 446 WPA Spółdzielnia Mechaników SMS Polska
Komora laminarna	BTE/AHC-4A1 Esco Singapur
Komora laminarna	POLON KL-21 Esco Singapur
Naczynka pomiarowe Osmo-Krio	Trident Med, Polska
Wialki Chromacol LTD	United Kingdom
Zakrętki Chromacol LTD	United Kingdom
Filtry Chromafil PET - 45/15 MS d=15 mm	Macherey Nagle GMBH
Destylator wody DE 870	Telmed, Warszawa

4. Przygotowanie oraz ocena właściwości fizykochemicznych roztworów substancji pomocniczych zastosowanych w badaniach

4.1. Składniki i sporządzanie roztworów buforowych przeznaczonych do recepturowych 1% i 5% (w/w) kropli do oczu z cefepimem

Tabela 8. Składniki buforu cytrynianowego I, II oraz III

Składniki buforów	Bufor I	Bufor II	Bufor III
Cytrynian sodu dwuwodny (mM/kg)	102,01 mM	204,02 mM	51,005 mM
Kwas cytrynowy jednowodny (mM/kg)	7,14 mM	14,28 mM	3,57 mM
Woda destylowana (g)	ad 1000,0	ad 1000,0	ad 1000,0

Przygotowanie buforów I, II i III:

Do wytarowanych zlewek przeniesiono odważone z dokładnością do 0,01g przepisane ilości cytrynianu sodu i kwasu cytrynowego. W połowie przepisanej ilości wody rozpuszczono cytrynian sodowy. Analogicznie przygotowano roztwór kwasu cytrynowego. Gotowe roztwory połączono, wymieszano i przesączono przez sączek ze szkła spiekanego typu Schott G-3. Bufory rozlano do butelek infuzyjnych, zamknięto korkami gumowymi oraz metalowymi kapslami i wyjaławiano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 min przy nadciśnieniu 101,4 kPa. Oceny jakościowej każdego z buforów dokonano zarówno przed jak i po wyjałowieniu. Wyniki badań przytoczono w tabeli 9.

Tabela 9. Właściwości fizykochemiczne buforów cytrynianowych I, II i III

Bufory	Przed wyjałowieniem			Po wyjałowieniu		
	Ciśnienie osmotyczne (mOsm/l)	pH	Wygląd roztworu	Ciśnienie osmotyczne (mOsm/l)	pH	Wygląd roztworu
Bufor I	301,0 ±1,5	6,24 ±0,05	bezbarwny, przezroczysty	298,3 ±2,00	6,20 ±0,02	bezbarwny, przezroczysty
Bufor II	590,2 ±3,0	6,11 ±0,01	bezbarwny, przezroczysty	586,1 ±1,15	6,05 ±0,01	bezbarwny, przezroczysty
Bufor III	170,0 ±1,0	6,25 ±0,01	bezbarwny, przezroczysty	167,2 ±3,46	6,20 ±0,01	bezbarwny, przezroczysty

4.2. Skład i sporządzanie roztworów alkoholu poliwinylowego (PVA) przeznaczonych do 1% i 5% (w/w) recepturowych kropli do oczu z cefepimem

Do recepturowych kropli do oczu ze zmodyfikowaną lepkością w każdym przypadku zastosowano alkohol poliwinylowy (m.cz. 72000). Skład roztworów alkoholu poliwinylowego przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Składniki 4% i 6% roztworów PVA

Stężenie PVA w roztworach pomocniczych	Składniki roztworów PVA (g)	
	Alkohol poliwinylowy m.cz. 72000	Woda destylowana
4%	40,0	ad 1000,0
6%	60,0	ad 1000,0

Przygotowanie 4% i 6% wodnych roztworów PVA:

W wytarowanym naczyniu na powierzchnię wody o temperaturze 20°C wsypywano powoli, mieszając, przepisaną ilość alkoholu poliwinylowego. Naczynie ogrzewano przez 1,5 h na wrzącej łaźni wodnej, cały czas mieszając. Po ochłodzeniu do temp. 20°C, uzupełniono wyparowaną wodę i roztwór przesączono przez sączek ze szkła spiekanego typu Schott G-1. Po godzinie zmierzono pH, ciśnienie osmotyczne oraz lepkość. Roztwory rozlano do butelek infuzyjnych, zamknięto gumowymi korkami oraz metalowymi kapslami i wyjaławiano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 min przy nadciśnieniu 101,4 kPa. Po wyjałowieniu ponownie zbadano pH, ciśnienie osmotyczne i lepkość. Wyniki badań przytoczono w tabeli 11.

Tabela 11. Właściwości fizykochemiczne 4% i 6% roztworów PVA

Roztwór 4% PVA							
Przed wyjałowieniem				Po wyjałowieniu			
Ciśnienie osmotyczne (mOsm/l)	pH	Lepkość η (mPa·s)	Wygląd roztworu	Ciśnienie osmotyczne (mOsm/l)	pH	Lepkość η (mPa·s)	Wygląd roztworu
12,7 ±1,15	5,70 ±0,01	18,36 ±0,10	bezbarwny, przezroczysty	13,20 ±0,1	5,00 ±0,01	17,21 ±0,11	bezbarwny, przezroczysty
Roztwór 6% PVA							
Przed wyjałowieniem				Po wyjałowieniu			
Ciśnienie osmotyczne (mOsm/l)	pH	Lepkość η (mPa·s)	Wygląd roztworu	Ciśnienie osmotyczne (mOsm/l)	pH	Lepkość η (mPa·s)	Wygląd roztworu
28,0 ±2,0	5,65 ±0,01	44,00 ±0,05	bezbarwny, przezroczysty	26,5 ±0,5	5,75 ±0,03	43,21 ±0,15	bezbarwny, przezroczysty

4.3. Sporządzanie roztworów pomocniczych substancji konserwujących

4.3.1. 0,04% roztwór boranu fenylortęciowego (50,0 g)

Do wytarowanej zlewki przeniesiono odważony z dokładnością do 0,001 g (0,02 g) boran fenylortęciowy. Substancję rozpuszczono w przepisanej ilości wody ogrzanej do temperatury około 95°C. Po ochłodzeniu do temperatury 20°C roztwór przesączono przez sączone ze szkła spiekanego typu Schott G-3, przelano do butelki infuzyjnej pojemności 50 ml, zamknięto gumowym korkiem oraz metalowym kapslem i wyjałowiono w autoklawie w temperaturze 121°C±2°C przez 20 minut przy nadciśnieniu 101,4 kPa. W warunkach aseptycznych roztwór rozlano do butelek z ciemnego szkła pojemności 10 ml, zakręcono zakraplaczem i oznaczono sygnaturą.

4.3.2. 2% roztwór tiomersalu (20,0 g)

Do wytarowanej zlewki przeniesiono odważony z dokładnością do 0,001 g (0,4 g) tiomersalu. Substancję rozpuszczono w wodzie o temperaturze pokojowej. Roztwór przesączono przez sączone ze szkła spiekanego typu Schott G-3, przelano do butelki infuzyjnej pojemności 50 ml i dalej postępowano jak w pkt. 4.3.1.

4.3.3. 0,5% roztwór chlorku benzalkoniowego (50,0 g)

Do wytarowanej zlewki przeniesiono odważony z dokładnością do 0,001g (0,25g) chlorek benzalkoniowy i uzupełniono wodą destylowaną o temperaturze pokojowej. Roztwór przesączono przez sączone ze szkła spiekanego typu Schott G-3 i dalej postępowano tak jak w pkt. 4.3.1.

4.3.4. 1% roztwór dioctanu chlorheksydyny (50,0 g)

Do wytarowanej zlewki przeniesiono odważony z dokładnością do 0,001 g dioctan chlorheksydyny. Substancję rozpuszczono w wodzie o temperaturze pokojowej. Roztwór przesączono przez sączone ze szkła spiekanego typu Schott G-3, dalej postępowano tak jak w pkt. 4.3.1.

4.3.5. Alkohol β-feniloetylowy (20,0 g)

W warunkach aseptycznych 100% alkohol β-feniloetylowy przelano do butelek z ciemnego szkła poj. 10 ml, nakręcono zakraplacze i oznaczono sygnaturą.

5. Ocena zgodności farmaceutycznej 1% i 5% roztworów wodnych cefepimu ze środkami pomocniczymi zastosowanymi w badaniach

Sporządzanie roztworów testowych

W celu zbadania zgodności cefepimu w stężeniu 1% i 5% z substancjami pomocniczymi, zastosowanymi w technologii kropli do oczu, sporządzono testowe roztwory, których skład przytoczono w tabeli 12. W warunkach aseptycznych do 1% i 5% wodnych roztworów antybiotyku dodawano oddzielnie substancje pomocnicze w ilościach odpowiadających ich stężeniom występującym w składzie kropli do oczu z cefepimem: chlorek sodu (0,9%), cytrynian sodu (6,0%), kwas cytrynowy (0,3%), alkohol poliwinylowy (2,0%), chlorek benzalkoniowy (0,005%), tiomersal (0,002% i 0,02%), dioctan chlorheksydyny (0,01%), boran fenylortęciowy (0,001%), alkohol β -fenyloetylowy (0,4%). Testowe wodne roztwory cefepimu z rozpuszczonymi w nich substancjami pomocniczymi przechowywano w temperaturze 4°C i 20 °C przez 10 dni bez dostępu światła i obserwowano pod kątem zabarwienia, przezroczystości i zapachu. Wyniki badań przytoczono w tabeli 12.

Tabela 12. 1% i 5% (w/w) roztwory wodne cefepimu oraz substancje pomocnicze zastosowane w badaniach zgodności farmaceutycznej

Skład 1% i 5% roztworów cefepimu	Substancje pomocnicze (g) dodawane do 10,0 g 1% lub 5% roztworu cefepimu	Cefepim 1%		Cefepim 5%	
		4°C	20°C	4°C	20°C
<u>Roztwór 1%</u> Cefepim 0,1 (Maxipime inj. 0,172) woda do iniekcji ad 10,0	chlorek sodu 0,09	-	-	-	-
	cytrynian sodu 0,3-0,6	-	-	-	-
	kwas cytrynowy 0,15-0,3	-	-	-	-
	chlorek benzalkoniowy 0,0005	+	+	+	+
	tiomersal 0,0002	+	+	+	+
<u>Roztwór 5%</u> Cefepim 0,5 (Maxipime inj. 0,862) woda do iniekcji ad 10,0	tiomersal 0,002	+	+	+	+
	dioctan chlorheksydyny 0,001	+	+	+	+
	boran fenylortęciowy 0,0001	-	-	-	+
	alkohol β -fenyloetylowy 0,04	-	-	-	-
	alkohol poliwinylowy 0,02-0,04	-	-	-	-

(+) interakcja, (-) brak interakcji

6. Aseptyczne sporządzanie recepturowych 1% i 5% (w/w) kropli do oczu z cefepimem w warunkach aseptycznych

Roztwory wodne cefepimu oraz wszystkie wersje kropli do oczu z cefepimem zostały wykonane w łoży z poziomym, laminarnym nawiewem jałowego powietrza.

6.1. Czynności przygotowawcze do pracy w warunkach aseptycznych

Roztwory substancji pomocniczych, zastosowane w 1% i 5% kroplach do oczu z cefepimem

Bufory I, II, III, roztwory PVA oraz roztwory środków konserwujących zostały sporządzone zgodnie z procedurami opisanymi w pkt. 4.1 - 4.3.

Przygotowanie łoży aseptycznej oraz sprzętu
Łoża do pracy w warunkach aseptycznych

Wewnętrzne powierzchnie łoży umyto gorącą wodą z detergentem i przetarto 1% wodnym, jałowym roztworem chlorku benzalkoniowego. W łoży umieszczono wyjałowiony sprzęt oraz opakowania z substancjami leczniczymi i roztworami substancji pomocniczych. Przed rozpoczęciem pracy na okres 30 minut włączono nawiew laminarny oraz lampę bakteriologiczną UV. Przystępując do pracy w łoży wyłączono lampę UV. Pracę kontynuowano przy włączonym nawiewie laminarnym. Po 2 godzinach pracę przerywano i ponownie na 30 minut włączano lampę UV.

Sprzęt szklany, porcelanowy i metalowy

Sprzęt umyto gorącą wodą z detergentem, wypłukano ciepłą wodą i następnie kilka razy wodą oczyszczoną. Wysuszony w suszarce sprzęt owinięto folią aluminiową, umieszczono w puszcze sterylizacyjnej i wyjałowiono w sterylizatorze powietrznym w temp. 180°C przez 30 minut.

Przygotowanie zakraplaczy

Zakraplacze umyto w ciepłej wodzie z detergentem, wypłukano w bieżącej wodzie oraz w wodzie oczyszczonej. W wyjałowionym słoiku z nakrętką zakraplacze zanurzono w jałowym 5% roztworze chlorku benzalkoniowego, uprzednio ogrzanym do temperatury

około 70°C. Słoik umieszczono w sterylizatorze powietrznym w temperaturze 70°C na okres 1 godziny. Po tym czasie słoik szczelnie zamknięto nakrętką, wyjęto ze sterylizatora i wyjaławianie kontynuowano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. W łożu aseptycznej zakraplacze starannie wypłukano wodą jałową i umieszczono w jałowym słoiku. Otwarty słoik umieszczono w sterylizatorze powietrznym (temp. 70°C). Po wysuszeniu zakraplaczy słoik szczelnie zamknięto i wyjęto ze sterylizatora.

Sączki membranowe

Obudowy sączków membranowych umyto w ciepłej wodzie z dodatkiem detergentu oraz wypłukano ciepłą wodą i dokładnie wodą oczyszczoną. Wewnątrz obudowy sączków umieszczono filtry membranowe o średnicy porów $0,22 \mu\text{m} \pm 0,01 \mu\text{m}$ firmy Sartorius. Sączki owinięto folią aluminiową, umieszczono w puszcze sterylizacyjnej i wyjałowiono w temperaturze $121^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ przez 20 minut.

Korki gumowe do butelek infuzyjnych

Korki umyto w ciepłej wodzie z detergentem i wypłukano bieżącą wodą oraz kilka razy wodą oczyszczoną. Korki zanurzono w wodzie jałowej i sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 30 minut. Korki wysuszono w sterylizatorze powietrznym w temperaturze 70°C. Wyjałowione i wysuszone korki przechowywano w szczelnie zamykanych sterylnych słoikach.

6.2. Sporządzanie 1% i 5% (w/w) wodnych roztworów cefepimu oraz 1% i 5% (w/w) kropli do oczu

Tabela 13. Skład recepturowych 1% i 5% kropli z zawartością cefepimu

Składniki (g) na 100 g kropli	1% w/w							5% w/w							
	Symbol wersji														
	0 _(1%)	1R	2R	3R	3aR	4R	4aR	0 _(5%)	IR	IaR	IIIR	IIIaR	IVR	IVaR	IVbR
Maxipime [®] (Cefepimum)	1,725	1,725	1,725	1,725	1,725	1,725	1,725	8,625	8,625	8,625	8,625	8,625	8,625	8,625	8,625
w przeliczeniu na jednowodny dichlorowodorek cefepimu	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
roztwór PVA 6% ($\eta=43,21\text{mPa}\cdot\text{s}$)	-	-	-	-	49,14		47,7	-	-	-	-	-	-	-	44,23
roztwór PVA 4%, ($\eta=17,21\text{mPa}\cdot\text{s}$)	-	-	-	49,14	-	47,7		-	-	-	45,70	45,70	44,23	44,23	-
0,04% roztwór boranu fenylortęciowego	-	-	2,5	-	-	2,5	2,5	-	-	-	-	-	2,5	2,5	2,5
alkohol β -fenyloetylowy	-	-	0,4	-	-	0,4	0,4	-	-	-	-	-	0,4	0,4	0,4
woda do iniekcji	98,30	-	-	-	-	-	-	91,40	-	-	-	-	-	-	-
bufor cytrynowy I pH=6,20; ciśn.osmot.=298 mOsm/L	-	98,30	95,40	-	-	-	-	-	91,40	-	-	45,70	-	44,23	44,23
bufor cytrynowy II pH=6,05; ciśn.osmot.=586 mOsm/L	-	-	-	49,14	49,14	47,7	47,7	-	-		45,70	-	44,23	-	-
bufor cytrynowy III pH=6,20; ciśn.osmot.=167 mOsm/L									-	91,40	-	-	-	-	-

6.2.1. Sporządzanie 1% i 5% (w/w) wodnych roztworów cefepimu: wersje 0_(1%) i 0_(5%)

W warunkach aseptycznych do jałowej zlewki przeniesiono odważoną z dokładnością do $\pm 0,001\text{g}$ przepisaną ilość Maxipime®inj, dodano wody do wstrzykiwań i mieszano do rozpuszczenia antybiotyku. Roztwór przesączono przez sącze membranowy o średnicy porów $0,22\ \mu\text{m} \pm 0,01\ \mu\text{m}$, przelano do butelek infuzyjnych. Butelki zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapsłami.

Roztwory wodne cefepimu wykonano w dwóch seriach. Roztwory przechowywano w temperaturze 4°C i 20°C przez 30 dni bez dostępu światła w chłodziarkach farmaceutycznych.

W ramach oceny jakościowej roztworów wodnych świeżo sporządzonych oraz w czasie ich przechowywania dokonywano oceny organoleptycznej (zabarwienie, przezroczystość, zapach), analizowano pH, ciśnienie osmotyczne, lepkość (badanie lepkości dotyczyło wyłącznie kropli z zawartością alkoholu poliwinylowego) oraz stężenie cefepimu metodą HPLC. Wyniki badań roztworów wodnych przedstawiono w tabelach 15-17, 38 i 45 oraz na rycinach 8-15 i 26-28 oraz 47-49.

6.2.2. Sporządzanie 1% i 5% kropli do oczu z cefepimem: wersje recepturowe nr 1R, IR i IaR

W warunkach aseptycznych do jałowej zlewki przeniesiono odważoną z dokładnością do $\pm 0,001\ \text{g}$ przepisaną ilość Maxipime®inj., dodano bufor I do wersji 1R i IR lub bufor III do wersji IaR, mieszano do rozpuszczenia antybiotyku. Krople przesączono przez sącze membranowy o średnicy porów $0,22\ \mu\text{m} \pm 0,01\ \mu\text{m}$, krople rozlano do butelek infuzyjnych, butelki zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapsłami. Dalej postępowano jak w pkt. 6.3. Wyniki badań przedstawiono w tabelach 15-17, 39, 46-47 oraz na rycinach 8-15 i 29-31, 50-55.

6.2.3. Sporządzanie 1% i 5% kropli do oczu z cefepimem: wersja recepturowa nr 2R

W warunkach aseptycznych do jałowej zlewki przeniesiono odważoną z dokładnością do $\pm 0,001\text{g}$ przepisaną ilość Maxipime®inj., dodano bufor I i mieszano do rozpuszczenia antybiotyku. Krople zakonserwowano 0,04% roztworem pomocniczym boranu fenylortęciowego do stężenia w kroplach 0,001%, dodano przepisaną ilość alkoholu

β -fenyloetylowego do stężenia 0,4%, dokładnie wymieszano, przesączono przez sącze membranowy o średnicy porów $0,22 \mu\text{m} \pm 0,01 \mu\text{m}$, dalej postępowano jak w pkt. 6.3. Wyniki badań przedstawiono w tabelach 15-17, 40 oraz na rycinach 8-15 i 32-34.

6.2.4. Sporządzanie 1% i 5% kropli do oczu z cefepimem: wersje recepturowe nr 3R, 3aR, IIIR, IIIaR

W warunkach aseptycznych do jałowej zlewki przeniesiono odważoną z dokładnością do $\pm 0,001$ g przepisaną ilość Maxipime®inj., dodano bufor II lub bufor I, mieszano do rozpuszczenia antybiotyku. Krople przesączono przez sącze membranowy o średnicy porów $0,22 \mu\text{m} \pm 0,01 \mu\text{m}$, dodano przepisaną ilość roztworu pomocniczego PVA o lepkości $\eta=17,21 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ lub o lepkości $\eta=43,21 \text{ mPa}\cdot\text{s}$. Krople po wymieszaniu rozlano do butelek infuzyjnych, dalej postępowano jak w pkt. 6.3. Wyniki badań przedstawiono w tabelach 15-18, 41-42, 48-49 oraz na rycinach 8-15, 35-40 i 56-61.

6.2.5. Sporządzanie 1% i 5% kropli do oczu z cefepimem: wersje recepturowe nr 4R, 4aR, IVR, IVaR, IVbR

W warunkach aseptycznych do jałowej zlewki przeniesiono odważoną z dokładnością do $\pm 0,001$ g przepisaną ilość Maxipime®inj., dodano buforu II lub buforu I. Roztwór zakonserwowano 0,04% roztworem boranu fenylortęciowego do stężenia w kroplach 0,001% oraz alkoholem β -fenyloetylowym do stężenia 0,4%. Po wymieszaniu krople przesączono przez sącze membranowy o średnicy porów $0,22 \mu\text{m} \pm 0,01 \mu\text{m}$, dodano przepisaną ilość roztworu PVA o lepkości $\eta=17,21 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ lub $\eta=43,21 \text{ mPa}\cdot\text{s}$. Krople rozlano do butelek infuzyjnych i dalej postępowano jak w pkt.6.3. Wyniki badań przedstawiono w tabelach 15-18, 43-44, 50-52 oraz na rycinach 8-15, 41-46 i 62-70.

6.2.6. Uzasadnienie zaprogramowanego składu wersji recepturowych kropli do oczu z 1% i 5% (w/w) zawartością cefepimu

Uzasadnienie zaprogramowanego składu kropli recepturowych z 1% i 5% zawartością cefepimu przedstawiono w tabeli 14.

Tabela 14. Cel wykonania poszczególnych wersji recepturowych

Wersja recepturowa	Cel wykonania poszczególnych wersji recepturowych
0 _(1%) i 0 _(5%)	Ocena właściwości fizykochemicznych i trwałości antybiotyku w 1% i 5% (w/w) roztworach wodnych cefepimu, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C przez 30 dni. Na podstawie otrzymanych wyników ciśnienia osmotycznego i pH ustalono również skład buforów cytrynianowych niezbędnych w składzie kropli.
1R, IR i IaR	Ocena wpływu buforów cytrynianowych na trwałość cefepimu w 1% i 5% (w/w) kroplach przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C przez 30 dni.
2 R	Ocena wpływu zastosowanych środków konserwujących na trwałość cefepimu w 1% i 5% (w/w) w buforowanych kroplach do oczu, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C przez 30 dni.
3R, 3aR, IIIR, IIIaR,	Ocena wpływu alkoholu poliwinylowego (zastosowanego w kroplach w postaci roztworów o lepkości $\eta = 17,21 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ oraz $\eta = 43,21 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) na trwałość cefepimu 1% i 5% (w/w) w buforowanych kroplach przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C przez 30 dni.
4R, 4aR, IVR, IVaR, IVbR	Ocena wpływu alkoholu poliwinylowego (zastosowanego w kroplach w postaci roztworów o lepkości $\eta = 17,21 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ oraz $\eta = 43,21 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) na trwałość cefepimu 1% i 5% (w/w) w buforowanych i konserwowanych kroplach, przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C przez 30 dni.

7. Ocena fizykochemiczna oraz wyniki oceny jakościowej 1% i 5% roztworów wodnych cefepimu, 1% i 5% recepturowych kropli do oczu z cefepimem świeżo sporządzonych oraz w czasie przechowywania przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C

7.1. Badania organoleptyczne

Oceny organoleptycznej roztworów wodnych cefepimu oraz kropli recepturowych z cefepimem dokonywano równoległe z oceną pH i ciśnienia osmotycznego oraz lepkości. Zmiany cech organoleptycznych roztworów wodnych oraz kropli obserwowane były podczas ich przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C przez 30 dni. Wyniki badań organoleptycznych 1% i 5% roztworów wodnych, 1% i 5% kropli recepturowych po sporządzeniu oraz podczas ich przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C przedstawiono w tabeli 15.

7.2. pH roztworów wodnych oraz kropli

pH roztworów wodnych oraz kropli określono przy pomocy pH-metru. pH 1% i 5 % roztworów wodnych oraz kropli do oczu w wersjach recepturowych mierzono w 6-dniowych odstępach podczas ich przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C przez 30 dni. Wyniki badań pH przedstawiono w tabeli 16 oraz na rycinach 8-11.

7.3. Ciśnienie osmotyczne

Ciśnienie osmotyczne roztworów wodnych oraz kropli określono przy użyciu osmometru. Ciśnienie osmotyczne 1% i 5 % roztworów wodnych oraz kropli do oczu w wersjach recepturowych mierzono w 6-dniowych odstępach czasu podczas przechowywania kropli w temperaturze 4°C i 20°C przez 30 dni. Wyniki badań ciśnienia osmotycznego przedstawiono w tabeli 17 oraz na rycinach 12-15.

7.4. Gęstości i lepkość kropli

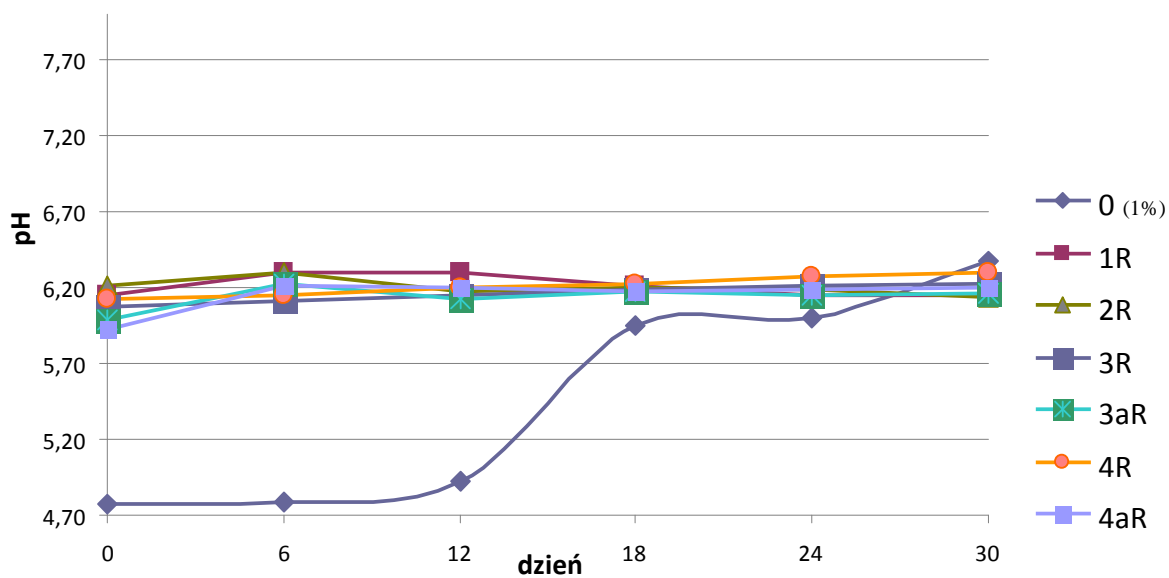
Gęstość kropli określono densytometrem: Densito 30PX. Lepkość kropli określono za pomocą wiskozymetru Höpplera. Pomiar gęstości i lepkości wykonano we wszystkich wersjach kropli, których lepkość zmodyfikowano poprzez wprowadzenie do ich składu roztworu alkoholu poliwinylowego (PVA). Wyniki badania gęstości i lepkości przedstawiono w tabeli 18.

Tabela 15. Cechy organoleptyczne 1% i 5% (w/w) kropli do oczu z cefepimem wersjach recepturowych

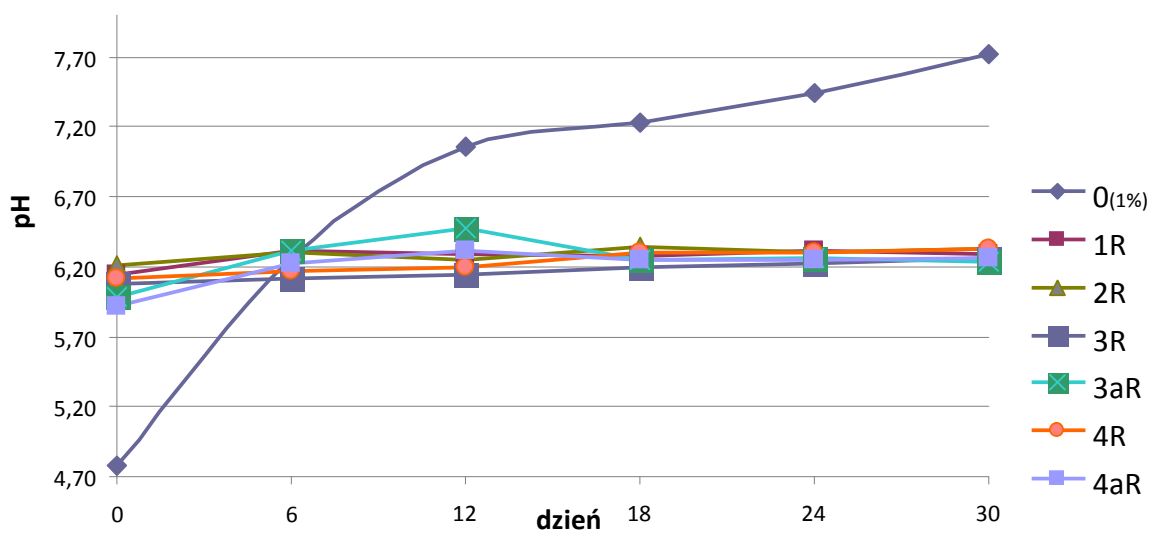
Wersja	Krople świeżo sporządzone	Czas trwałości cefepimu w kroplach w temp. 4°C (dzień)	Cechy organoleptyczne w końcowych dniach trwałości kropli w temp. 4°C	Czas trwałości cefepimu w kroplach w temp. 20°C (dzień)	Cechy organoleptyczne w końcowych dniach trwałości kropli w temp. 20°C
Zabarwienie, przezroczystość, zapach					
0_(1%)	przezroczysty, bezbarwny, zapach antybiotyku	24	przezroczysty, żółty, zapach produktów rozpadu	3	przezroczysty, bursztynowy, zapach produktów rozpadu
1R	przezroczysty, bezbarwny, zapach antybiotyku	27	przezroczysty, jasnożółty, zapach produktów rozpadu	3	przezroczysty, żółty, zapach produktów rozpadu
2R	przezroczysty, bezbarwny, zapach antybiotyku i konserwantów	24	przezroczysty, słomkowy, zapach produktów rozpadu i konserwantu	3	przezroczysty cytrynowy, zapach produktów rozpadu i konserwantów
3R	przezroczysty, bezbarwny, zapach antybiotyku	24	przezroczysty, słomkowy, zapach produktów rozpadu	6	przezroczysty, cytrynowy, zapach produktów rozpadu
3aR	przezroczysty, bezbarwny, zapach antybiotyku	21	przezroczysty, słomkowy, zapach produktów rozpadu	3	przezroczysty, jasnożółty, zapach produktów rozpadu
4R	przezroczysty, bezbarwny, zapach antybiotyku i konserwantów	27	przezroczysty, jasnożółty, zapach produktów rozpadu i konserwantu	6	przezroczysty żółty, zapach produktów rozpadu i konserwantów
4aR	przezroczysty, bezbarwny, zapach antybiotyku i konserwantów	21	przezroczysty, słomkowy, zapach produktów rozpadu	6	przezroczysty, jasnożółty, zapach produktów rozpadu
0_(5%)	przezroczysty, jasnożółty, zapach antybiotyku	18	przezroczysty, żółty, zapach produktów rozpadu	3	przezroczysty, bursztynowy, zapach produktów rozpadu
IR	przezroczysty, jasnożółty, zapach antybiotyku	18	przezroczysty, cytrynowy, zapach produktów rozpadu i konserwantu	3	przezroczysty, żółty, zapach produktów rozpadu i konserwantów
IaR	Przezroczysty, lekko żółty, zapach antybiotyku	18	przezroczysty, cytrynowy, zapach produktów rozpadu	3	przezroczysty, żółty, zapach produktów rozpadu
IIIR	przezroczysty, jasnożółty, zapach antybiotyku	12	przezroczysty, cytrynowy, zapach produktów rozpadu	3	przezroczysty, żółty, zapach produktów rozpadu
IIIaR	przezroczysty, jasnożółty, zapach antybiotyku	21	przezroczysty, żółty, zapach produktów rozpadu i konserwantu	6	przezroczysty, ciemnożółty, zapach produktów rozpadu i konserwantów
IVR	przezroczysty, jasnożółty, zapach antybiotyku i konserwantów	12	przezroczysty, cytrynowy, zapach produktów rozpadu	3	przezroczysty, żółty, zapach produktów rozpadu
IVaR	przezroczysty, jasnożółty, zapach antybiotyku i konserwantów	21	przezroczysty, żółty, zapach produktów rozpadu i konserwantu	3	przezroczysty, ciemnożółty, zapach produktów rozpadu i konserwantów
IVbR	przezroczysty, jasnożółty, zapach antybiotyku i konserwantów	12	przezroczysty, cytrynowy, zapach produktów rozpadu	3	przezroczysty, żółty, zapach produktów rozpadu

Tabela 16. pH 1% i 5% (w/w) kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych przechowywanych przez 30 dni w temp. 4°C i 20°C

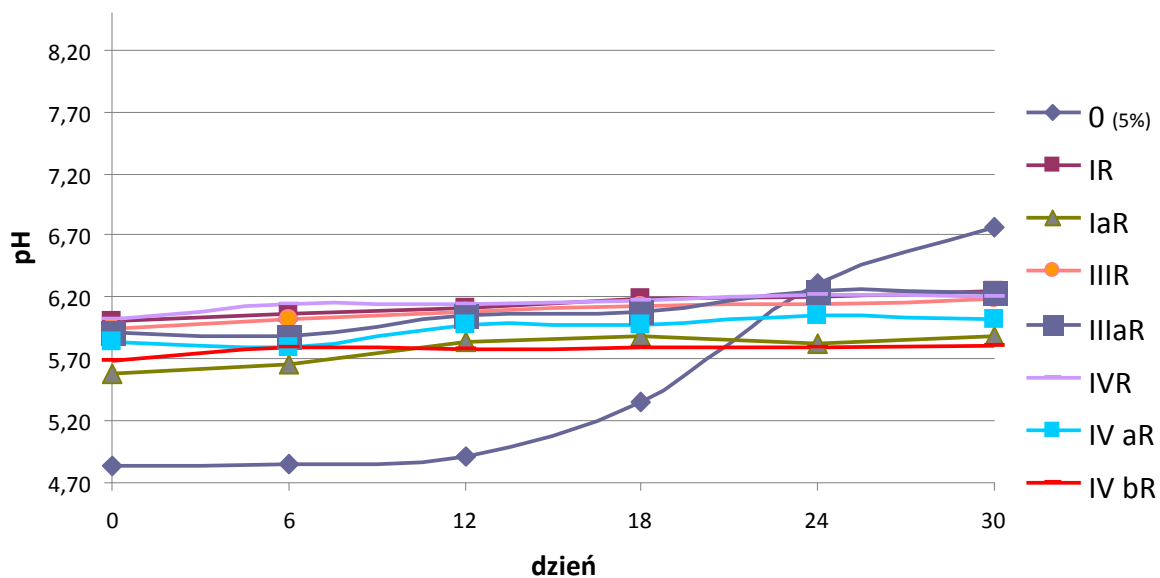
Wersja	pH											
	Czas przechowywania (dni)											
	0	6		12		18		24		30		
	+4°C	+20°C	+4°C	+20°C	+4°C	+20°C	+4°C	+20°C	+4°C	+20°C	+4°C	+20°C
0_{1%}	4,78 ±0,03	4,79 ±0,02	6,26 ± 0,01	4,92 ±0,01	7,06 ± 0,02	5,95 ±0,01	7,23 ± 0,01	6,00 ±0,02	7,45 ± 0,01	6,37 ±0,02	7,72 ± 0,02	
1R	6,15 ±0,01	6,30 ± 0,00	6,32 ± 0,01	6,30 ±0,01	6,29 ± 0,02	6,21 ± 0,01	6,28 ± 0,01	6,15 ± 0,02	6,32 ± 0,01	6,15 ± 0,01	6,29 ± 0,01	
2R	6,21 ± 0,00	6,30 ± 0,01	6,31 ± 0,01	6,18 ± 0,01	6,25 ± 0,01	6,20 ± 0,01	6,35 ± 0,01	6,19 ± 0,02	6,30 ± 0,01	6,14 ± 0,01	6,33 ± 0,01	
3R	6,08 ± 0,01	6,11 ± 0,02	6,12 ± 0,01	6,15 ± 0,01	6,14 ± 0,01	6,19 ± 0,02	6,20 ± 0,01	6,21 ± 0,01	6,22 ± 0,02	6,23 ± 0,00	6,26 ± 0,01	
3aR	5,99 ± 0,01	6,23 ± 0,01	6,32 ± 0,01	6,13 ± 0,01	6,47 ± 0,01	6,17 ± 0,01	6,25 ± 0,01	6,15 ± 0,01	6,26 ± 0,01	6,16 ± 0,01	6,24 ± 0,01	
4R	6,12 ± 0,01	6,15 ± 0,01	6,17 ± 0,01	6,20 ± 0,01	6,20 ± 0,01	6,23 ± 0,01	6,31 ± 0,01	6,27 ± 0,01	6,31 ± 0,01	6,30 ± 0,01	6,33 ± 0,02	
4aR	5,92 ± 0,01	6,21 ± 0,01	6,23 ± 0,01	6,20 ± 0,01	6,32 ± 0,01	6,18 ± 0,01	6,25 ± 0,01	6,19 ± 0,01	6,25 ± 0,01	6,20 ± 0,01	6,26 ± 0,01	
0_{5%}	4,83 ± 0,01	4,85 ± 0,02	6,35 ± 0,01	4,91 ± 0,03	6,72 ± 0,01	5,35 ± 0,03	7,15 ± 0,02	6,31 ± 0,02	7,61 ± 0,01	6,76 ± 0,01	8,21 ± 0,01	
IR	6,00 ± 0,01	6,07 ± 0,01	6,09 ± 0,01	6,12 ± 0,01	6,27 ± 0,01	6,19 ± 0,01	6,46 ± 0,01	6,20 ± 0,01	6,72 ± 0,00	6,25 ± 0,02	6,79 ± 0,01	
IaR	5,58 ± 0,01	5,66 ± 0,01	5,99 ± 0,01	5,84 ± 0,01	6,24 ± 0,01	5,88 ± 0,01	6,61 ± 0,01	5,83 ± 0,02	6,96 ± 0,01	5,89 ± 0,01	7,16 ± 0,01	
IIIR	5,95 ± 0,01	6,02 ± 0,01	6,07 ± 0,01	6,09 ± 0,02	6,24 ± 0,02	6,13 ± 0,02	6,45 ± 0,02	6,14 ± 0,02	6,74 ± 0,02	6,19 ± 0,02	7,06 ± 0,01	
IIIaR	5,92 ± 0,01	5,88 ± 0,00	5,94 ± 0,01	6,05 ± 0,05	6,15 ± 0,02	6,09 ± 0,02	6,20 ± 0,01	6,25 ± 0,01	6,30 ± 0,05	6,23 ± 0,05	7,02 ± 0,01	
IVR	6,02 ± 0,02	6,14 ± 0,02	6,17 ± 0,02	6,15 ± 0,01	6,21 ± 0,01	6,17 ± 0,02	6,37 ± 0,02	6,22 ± 0,02	6,71 ± 0,02	6,21 ± 0,03	7,01 ± 0,02	
IVaR	5,84 ± 0,02	5,80 ± 0,02	5,86 ± 0,01	5,97 ± 0,01	6,00 ± 0,01	5,98 ± 0,02	5,93 ± 0,01	6,05 ± 0,02	6,12 ± 0,01	6,02 ± 0,01	7,06 ± 0,01	
IVbR	5,69 ± 0,01	5,79 ± 0,04	5,91 ± 0,01	5,78 ± 0,01	6,06 ± 0,01	5,79 ± 0,01	6,38 ± 0,01	5,79 ± 0,01	6,69 ± 0,06	5,81 ± 0,006	6,88 ± 0,01	



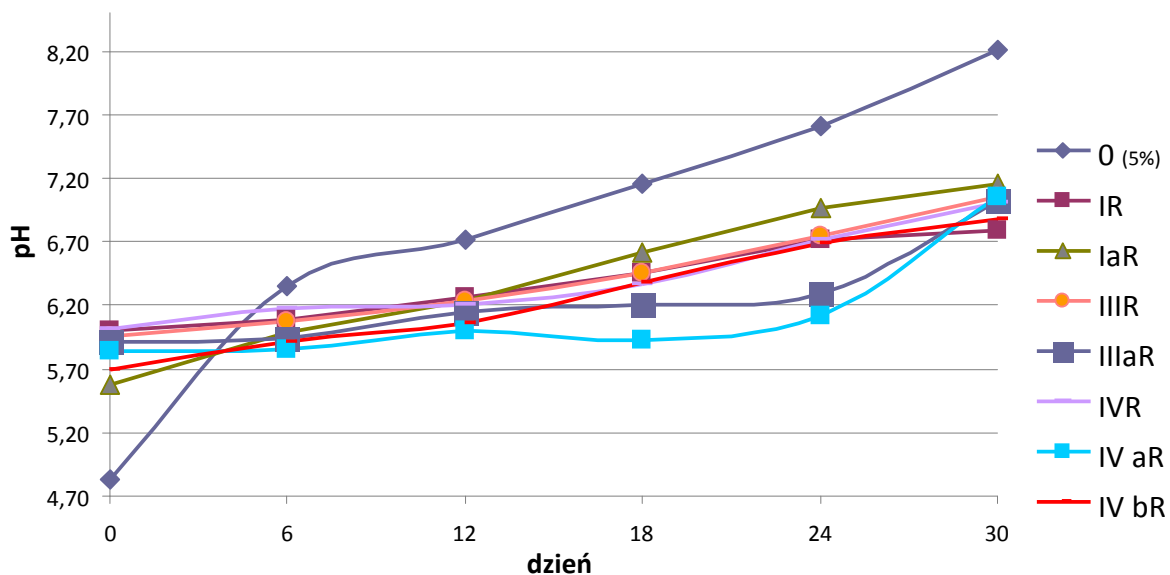
Rycina 8. pH 1% roztworów wodnych oraz 1% kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych podczas przechowywania przez 30 dni w temp. 4°C.



Rycina 9. pH 1% roztworów wodnych oraz 1% kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych podczas przechowywania przez 30 dni w temp. 20°C.



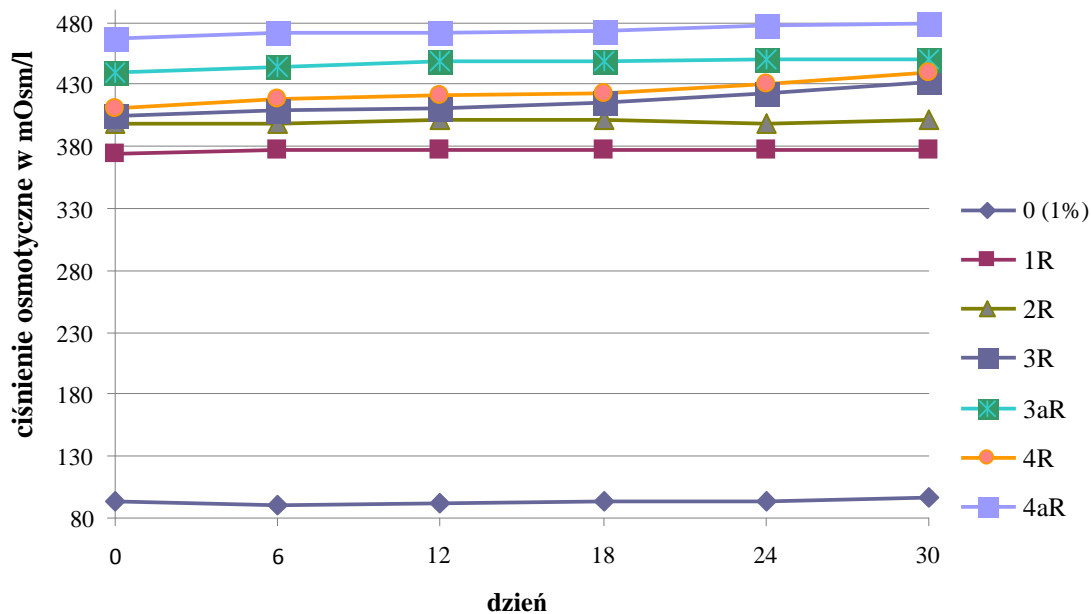
Rycina 10. pH 5% roztworów wodnych oraz 5% kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych podczas przechowywania przez 30 dni w temp. 4°C



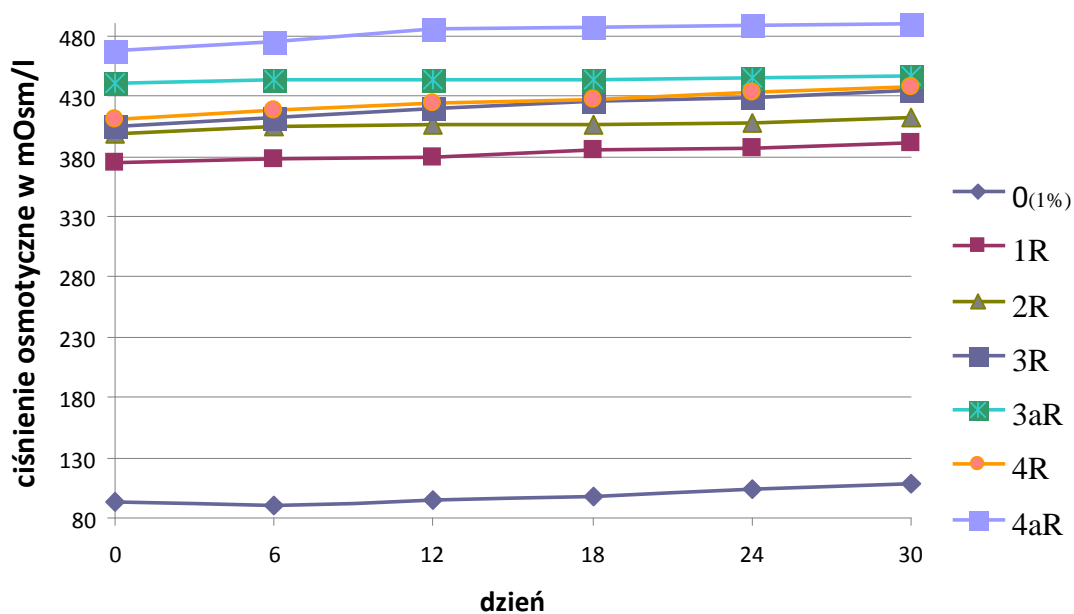
Rycina 11. pH 5% roztworów wodnych oraz 5% kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych podczas przechowywania przez 30 dni w temp. 20°C

Tabela 17. Ciśnienie osmotyczne 1% i 5% (w/w) kropli do oczu z cefepimem wersjach recepturowych przechowywanych przez 30 dni w temp. 4°C i 20°C

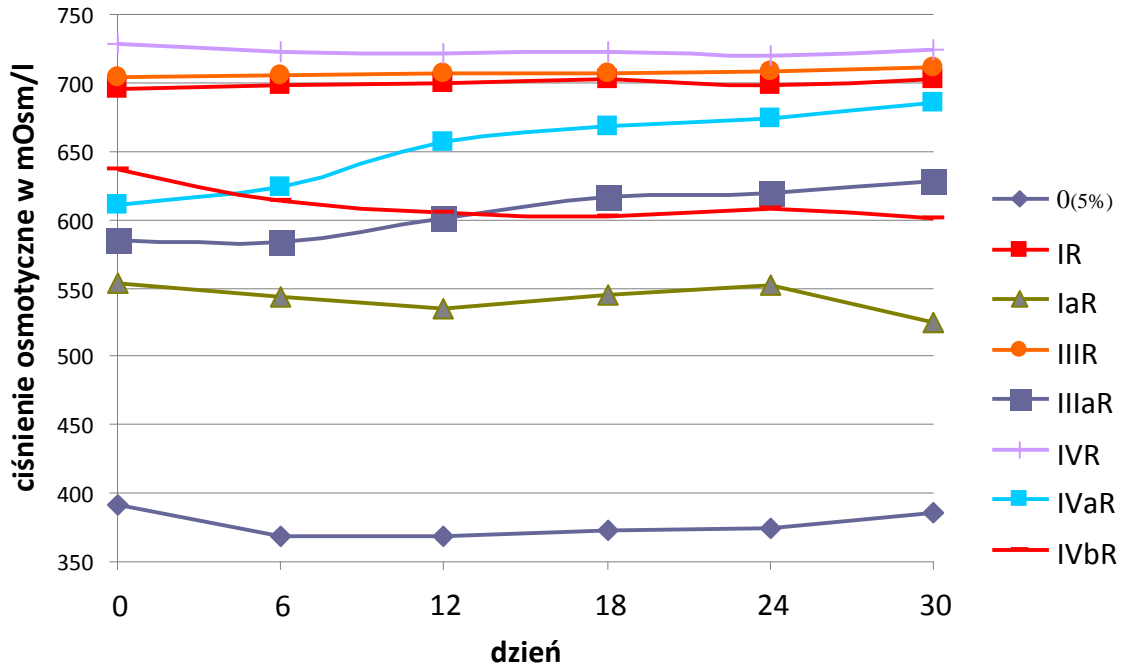
Wersja	Ciśnienie osmotyczne (mOsm/l)										
	Czas przechowywania (dni)										
	0	6		12		18		24		30	
	+4°C	+20°C	+4°C	+20°C	+4°C	+20°C	+4°C	+20°C	+4°C	+20°C	+20°C
0_(1%)	93,0 ± 1,0	91,3 ± 0,0	90,0 ± 2,3	92,7 ± 1,1	95,0 ± 1,1	94,3 ± 2,3	98,0 ± 1,1	94,0 ± 2,3	104,0 ± 1,1	97,0 ± 1,1	108,3 ± 1,1
1R	374,7 ± 0,6	376,7 ± 1,5	377,7 ± 0,6	377,3 ± 0,6	380,0 ± 0,0	377,3 ± 0,6	385,3 ± 1,2	376,7 ± 0,6	386,7 ± 0,6	377,7 ± 0,6	391,7 ± 0,6
2R	398,7 ± 0,6	398,3 ± 1,2	404,3 ± 0,6	401,0 ± 0,0	406,7 ± 1,5	401,7 ± 1,2	405,7 ± 0,6	399,3 ± 2,1	407,7 ± 0,6	401,7 ± 0,6	411,7 ± 0,6
3R	404,7 ± 2,5	408,7 ± 1,2	412,0 ± 1,0	410,3 ± 0,6	419,0 ± 0,6	414,7 ± 0,6	425,0 ± 0,6	423,3 ± 1,2	429,0 ± 0,0	431,7 ± 0,6	434,0 ± 0,6
3aR	440,3 ± 5,8	445,0 ± 1,0	443,0 ± 1,0	448,7 ± 0,6	443,7 ± 0,6	449,0 ± 1,0	444,3 ± 1,5	450,0 ± 0,6	444,7 ± 0,6	450,3 ± 0,6	446,3 ± 0,6
4R	411,0 ± 1,0	418,0 ± 1,0	417,7 ± 0,6	421,0 ± 1,0	424,3 ± 0,6	423,3 ± 1,5	427,7 ± 0,6	430,0 ± 1,0	433,7 ± 1,2	439,3 ± 0,6	438,0 ± 1,7
4aR	467,3 ± 0,6	471,0 ± 1,0	475,7 ± 4,5	472,3 ± 1,1	485,3 ± 6,5	472,7 ± 0,6	487,3 ± 0,6	477,3 ± 2,1	488,3 ± 0,6	480,0 ± 1,0	489,3 ± 0,6
0_(5%)	391,3 ± 2,2	368,0 ± 0,6	373,3 ± 1,2	368,7 ± 1,0	381,3 ± 1,0	372,6 ± 1,1	392,7 ± 1,0	375,0 ± 2,0	402,3 ± 1,0	385,7 ± 2,0	428,3 ± 1,15
IR	695,7 ± 1,0	698,6 ± 0,6	706,0 ± 1,0	700,0 ± 1,1	726,0 ± 1,0	703,2 ± 0,6	713,2 ± 0,0	698,0 ± 0,6	728,3 ± 0,6	702,0 ± 1,2	747,0 ± 1,5
IaR	553,0 ± 2,6	543,3 ± 4,2	547,0 ± 2,0	535,0 ± 1,0	564,3 ± 2,1	544,7 ± 3,2	556,7 ± 1,2	552,7 ± 1,2	565,3 ± 3,1	525,0 ± 1,00	563,3 ± 1,2
IIIR	704,3 ± 1,5	705,3 ± 0,6	680,3 ± 2,0	706,7 ± 1,2	667,0 ± 3,1	707,7 ± 2,0	681,7 ± 2,0	708,3 ± 1,2	688,3 ± 1,2	710,7 ± 2,1	692,0 ± 1,5
IIIaR	585,7 ± 2,0	584,0 ± 1,0	577,0 ± 2,0	600,7 ± 1,5	600,3 ± 1,0	616,7 ± 2,0	630,0 ± 1,0	619,3 ± 2,0	622,7 ± 1,2	628,3 ± 1,0	642,7 ± 1,2
IVR	728,7 ± 3,1	722,3 ± 1,5	722,7 ± 2,0	721,0 ± 2,0	716,7 ± 1,2	722,7 ± 2,0	720,7 ± 1,5	719,7 ± 1,2	723,7 ± 2,0	724,3 ± 3,0	726,0 ± 1,5
IVaR	611,0 ± 0,6	624,0 ± 1,6	628,0 ± 2,0	656,7 ± 3,1	641,0 ± 1,1	667,7 ± 1,2	678,0 ± 1,0	673,7 ± 3,0	692,3 ± 0,6	685,2 ± 3,0	702,3 ± 0,6
IVbR	636,7 ± 2,9	613,7 ± 4,2	613,7 ± 1,1	605,7 ± 4,0	618,0 ± 2,0	602,3 ± 1,5	605,3 ± 2,5	608,0 ± 2,6	628,0 ± 2,6	601,3 ± 1,5	628,7 ± 2,1



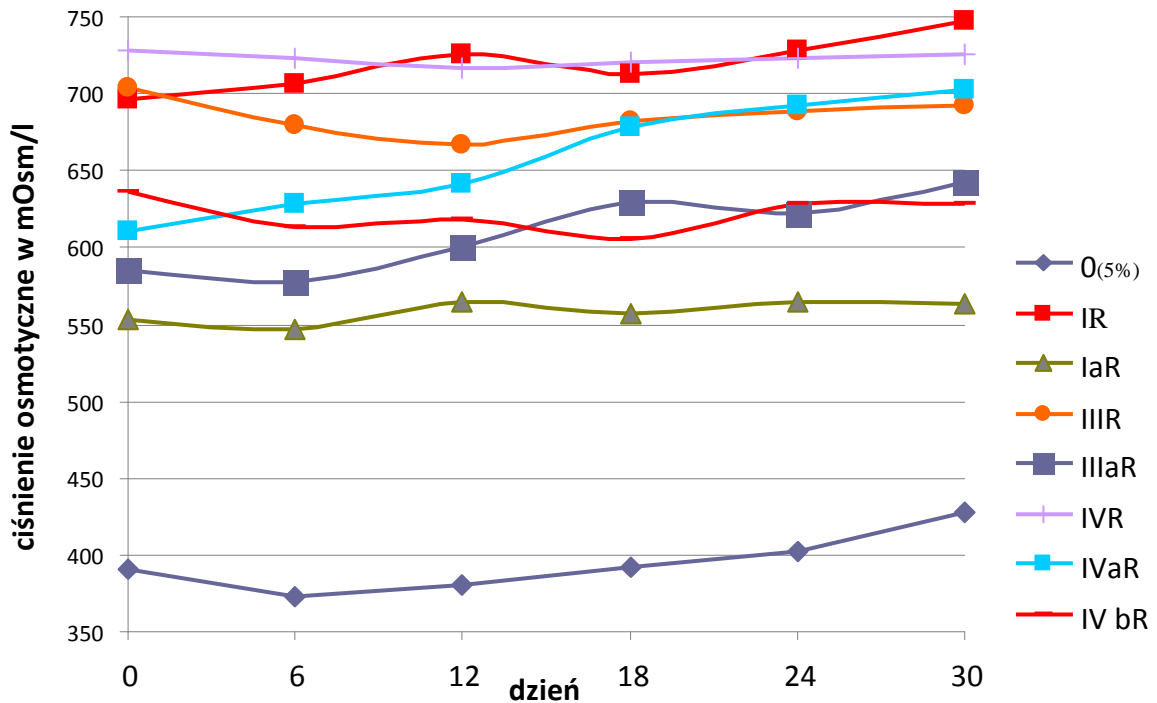
Rycina 12. Ciśnienie osmotyczne 1% roztworów wodnych oraz 1% kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych podczas przechowywania przez 30 dni w temp. 4°C



Rycina 13. Ciśnienie osmotyczne 1% roztworów wodnych oraz 1% kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych podczas przechowywania przez 30 dni w temp. 20°C



Rycina 14. Ciśnienie osmotyczne 5% roztworów wodnych oraz 5% kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych podczas przechowywania przez 30 dni w temp. 4°C



Rycina 15. Ciśnienie osmotyczne 5% roztworów wodnych oraz 5% kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych podczas przechowywania przez 30 dni w temp. 20°C

Tabela 18. Wyniki badań gęstości i lepkości kropli do oczu z 1% i 5 % (w/w) zawartością cefepimu w wersjach recepturowych o modyfikowanej lepkości

Wersja o modyfikowanej lepkości	Gęstość (g/ml)			Lepkość (mPa·s)		
	Dzień			Dzień		
	0	30		0	30	
		+4°C	+20°C		+4°C	+20°C
3R	1,0371 ±0,0001	1,0370 ±0,0001	1,0370 ±0,0001	5,21 ±0,01	5,25 ±0,01	5,31 ±0,01
3aR	1,0295 ±0,0001	1,0296 ±0,0002	1,0296 ±0,0001	9,16 ±0,15	9,34 ±0,14	9,42 ±0,15
4R	1,0399 ±0,0001	1,0399 ±0,0001	1,0399 ±0,0001	4,93 ±0,14	5,11 ±0,14	5,23 ±0,14
4aR	1,0271 ±0,0002	1,0272 ±0,0002	1,0275 ±0,0003	8,54 ±0,05	8,81 ±0,05	8,91 ±0,05
III R	1,0405 ±0,0001	1,0408 ±0,0001	1,0408 ±0,0001	5,52 ±0,03	5,71 ±0,03	5,94 ±0,03
IIIaR	1,0397 ±0,0001	1,0397 ±0,0002	1,0398 ±0,0001	5,37 ±0,10	5,44 ±0,10	5,62 ±0,10
IV R	1,0397 ±0,0002	1,0397 ±0,0003	1,0397 ±0,0003	5,01 ±0,15	5,20 ±0,15	5,51 ±0,15
IVaR	1,0401 ±0,0001	1,0401 ±0,0001	1,0401 ±0,0001	4,95 ±0,03	5,06 ±0,03	5,25 ±0,03
IVbR	1,0225 ±0,0001	1,0225 ±0,0001	1,0225 ±0,0001	8,15 ±0,02	8,35 ±0,02	8,55 ±0,02

8. Oznaczanie stężenia cefepimu metodą HPLC w 1% i 5% roztworach wodnych, w 1% i 5% recepturowych kroplach oraz w 1% i 5% kroplach „przemysłowych” świeżo sporządzonych i w czasie przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C

Oznaczanie stężenia cefepimu w roztworach wodnych i kroplach do oczu w wersjach recepturowych wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) ze wzorcem zewnętrznym. Zgodnie z założeniami pracy metoda została również zastosowana do oznaczania zawartości cefepimu w kroplach „przemysłowych”, co zostało opisane w pkt. 10.3.5.

8.1. Przygotowanie eluenta

Eluent przeznaczony do oznaczania zawartości cefepimu w kroplach przygotowano według następującego składu:

- ✓ sól sodowa kwasu 1-pentanosulfonowego 2,45622 g
- ✓ woda do HPLC 940 ml
- ✓ 99% kwas octowy do pH 3,4
- ✓ 45% wodorotlenek potasu do pH 4,0
- ✓ acetonitryl 60 ml (tj. 46,06 g)

Fazę ruchomą przygotowano jednorazowo w ilości 1000 ml.

Przygotowanie 45% roztworu KOH:

Do wytarowanej zlewki odważono z dokładnością 0,01g 45,0 g wodorotlenku potasu i uzupełniono wodą do HPLC do 100 g. Dokładnie wymieszano do rozpuszczenia KOH.

Przygotowanie fazy ruchomej:

Do wytarowanej zlewki odważono z dokładnością do 0,00001 g 2,45622 g soli sodowej kwasu 1-pentanosulfonowego, następnie uzupełniono do 940,0 ml wodą do HPLC. Roztwór doprowadzono do pH 3,4 (w temperaturze 25°C) za pomocą lodowatego kwasu octowego, a następnie do pH 4,0 za pomocą 45% wodorotlenku potasu. Dodano 46,06 g (60,0 ml) acetonitrylu i przesączono przez filtr Millicup-LH o wielkości porów 0,45 µm. Eluent odgazowano przy pomocy ultradźwięków.

8.2. Przygotowanie układu chromatograficznego

Każdorazowo przed pierwszym nastrzykiem układ chromatograficzny RP-HPLC z kolumną Gemini C18 (250 mm + 5 mm x 4,6 mm) i eluentem przygotowanym wg pkt. 8.1. doprowadzono do stanu gotowości operacyjnej (stałe ciśnienie i linia bazowa z minimalnym dryftem przy przepływie 1,5 ml/min). Po zakończeniu prowadzonych analiz układ chromatograficzny płukano mieszaniną 65% acetonitrylu i 35% wody w celu regeneracji kolumny. Przepłukanie zabezpieczało układ przed osadzaniem się wykrywalnych składników buforów stosowanych w analizie HPLC na uszczelkach, głowicach i tłokach pomp.

8. 3. Wymagane i uzyskane parametry rozdziału chromatograficznego

Metoda ilościowego oznaczania zawartości cefepimu w roztworach wodnych i kroplach została opracowana na podstawie monografii Farmakopei Amerykańskiej USP 32: „Cefepime hydrochloride” oraz „Cefepime for injection”. Wymagane oraz uzyskane parametry metody chromatograficznej zostały przedstawione w tabeli 19 [104].

Tabela 19. Parametry metody chromatograficznej

PORÓWNANIE PARAMETRÓW UZYSKANYCH W CZASIE ANALIZY Z WYMAGANIAMI FARMAKOPEI AMERYKAŃSKIEJ (USP 32)	
T_F – współczynnik ogonowania	Dla cefepimu nie więcej niż 1,7 - we wszystkich przeprowadzonych analizach uzyskano wartość współczynnika ogonowania TF poniżej 1,7.
N- ilość póltek teoretycznych	Dla chlorowodorku cefepimu nie mniej niż 1500 – we wszystkich przeprowadzonych analizach uzyskano wartości N póltek teoretycznych powyżej 1500 (tj. pow. 6000 póltek/metr)
R_S – rozdzielczość	Do oznaczeń ilościowych > 1,5 (2,0) – we wszystkich przeprowadzonych analizach rozdzielczość wynosiła powyżej 1,5.
k - współczynnik retencji	Celem uzyskania optymalnej rozdzielczości R _s wartość k powinna zawierać się w przedziale 1,0-10,0; idealne warunki rozdzielania zapewnia wartość k od 2,0 do 5,0. W przeprowadzonych analizach wartość k mieściła się w granicach od 2 do 5.

Warunki elucji:

- kolumna Gemini z prekolumną (250 mm+50 mm) x 4,6 mm; ziarno 5 µm; C18; porowatość 110Å
- przepływ 1,5 ml/min
- ciśnienie pomp dwutłokowych P1=17,0 mPa ; P2=17,0 mPA
- temp. 25°C - kolumna termostatowana
- detektor diodowy PDA, długość fali λ=254 nm
- nastrzyk 5 µl (5% roztwory wodne i krople) i 10 µl (1% roztwory wodne i krople do oczu)
- elucja izokratyczna
- marker-uracyl
- eluent wg składu przedstawionego w pkt. 8.1.

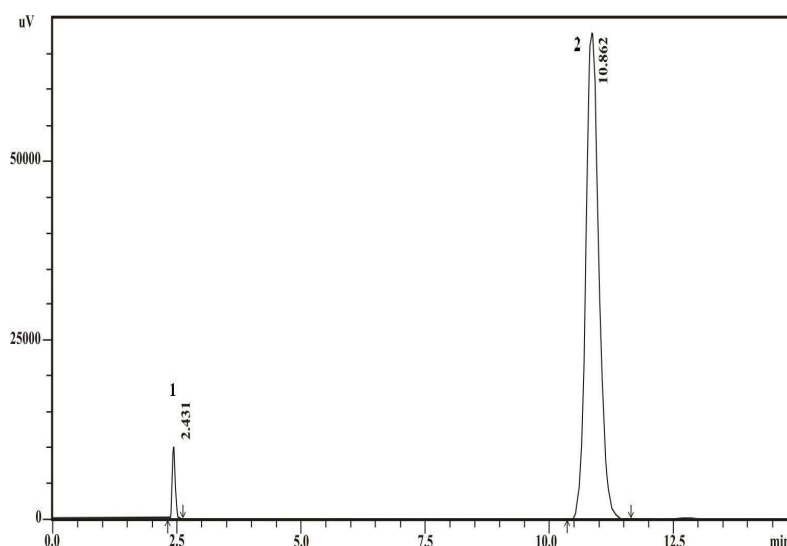
8.4. Przygotowanie krzywych kalibracyjnych dla oznaczeń ilościowych cefepimu metodą wzorca zewnętrznego

Do oznaczenia zawartości cefepimu w 1% i 5% kroplach do oczu w wersjach recepturowych i „przemysłowych” wykonano podczas całego cyklu badań 4 krzywe kalibracyjne. Dwie pierwsze krzywe kalibracyjne zastosowano do obliczeń zawartości cefepimu w roztworach wodnych oraz w wersjach recepturowych kropli do oczu. W celu sporządzenia każdej 6-cio punktowej krzywej kalibracyjnej przygotowano roztwory wzorcowe cefepimu o stężeniach zawartych w granicach od około 12,60 µg/ml do około 125,20 µg/ml. Równania

regresji otrzymane z analizy poszczególnych krzywych kalibracyjnych oraz odpowiadające im oznaczane wersje recepturowe i wersje „przemysłowe” przedstawiono w tabeli 20. Przykładowy chromatogram uzyskany z analizy roztworu wzorcowego cefepimu w stężeniu 5,0 mg/50 ml (tj. 100 µg/ml) przedstawiono na rycinie 16.

Tabela 20. Równania regresji zastosowane do oznaczania stężenia cefepimu w poszczególnych wersjach 1% i 5% kropli recepturowych oraz kropli „przemysłowych”

Symbole 1% i 5% kropli recepturowych i kropli „przemysłowych”		Równania regresji zastosowane w obliczeniach
Wersje recepturowe	0 _{1%} , 1R, 2R, 3R, 4R, 0 _{.5%} , IR, IIIR, IVR	$y=239414x-2982$
	3aR, 4aR, IaR, IIIaR, IVaR, IVbR	$y=246336x-3266,9$
Wersje „przemysłowe”	1P0, 2P0, 3P0, 4P0, I P 0, III P0, IVP0 (przygotowane na świeżo sporządzonym rozpuszczalniku)	$y=251095x-15221$
	1P6, 2P6, 3P6, 4P6, I P6, III P6, IVP6 (przygotowane na rozpuszczalniku po 6 miesiącach jego przechowywania w temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% - test przyspieszonego starzenia)	$y=245642x-2262,4$



Rycina 16. Chromatogram roztworu wodnego wzorca dichlorowodorku cefepimu (CRS), 1-pik uracylu, 2- pik cefepimu

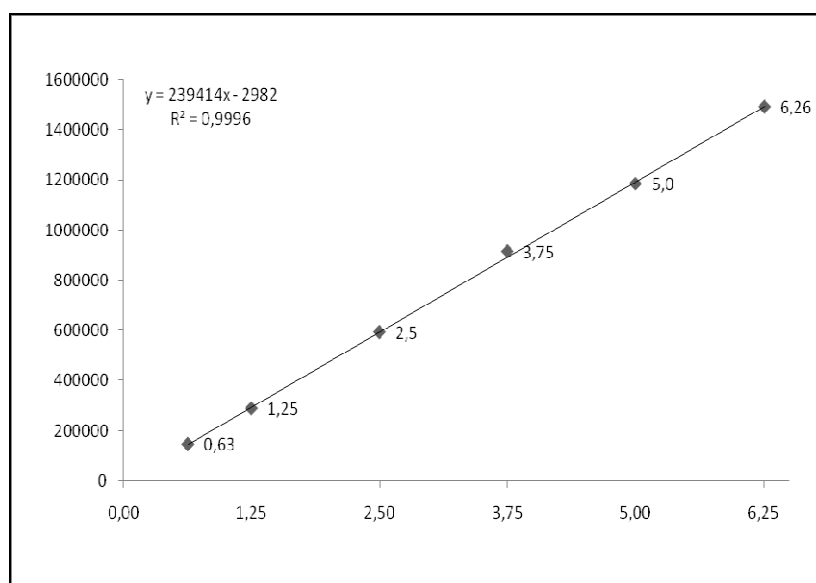
Tok postępowania:

Na wadze analitycznej odważono z dokładnością do 0,00001g poszczególne naważki dla każdego stężenia wzorca cefepimu, przeniesiono je ilościowo do kolb miarowych o pojemności 100 ml i uzupełniono wodą ultraczystą do wymaganej objętości. Dokładnie wymieszano. Do każdej

kolby dodano uracyl, który spełniał rolę markera i przesączono przez sącdek o średnicy porów 0,45 μm do wialki o poj. 1,5 ml. Wialki umieszczono w autosamplerze. Dla każdego z otrzymanych stężeń wykonano trzy nastrzyki (po 10 μl). Długość fali detektora $\lambda=254$ nm. Wyniki badań przedstawiono w tabelach 21-24 oraz na rycinach 17-20. Istotność korelacji oraz regresji krzywych kalibracyjnych została potwierdzona oceną statystyczną przedstawioną w tabeli 25 [131-132].

Tabela 21. Wyniki pomiarów dla kolejnych stężeń wzorca cefepimu dla równania $y=239414x-2982$

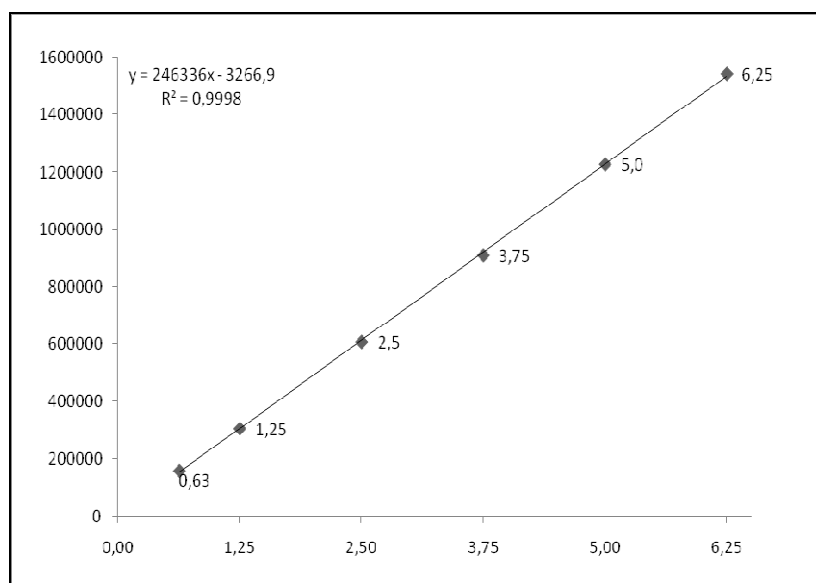
Stężenie wzorca w mg/50ml	Stężenie wzorca w przeliczeniu na $\mu\text{g/ml}$	Pole powierzchni pików cefepimu			Średnia powierzchnia pików uzyskana z trzech prób
		Nastrzyk 1	Nastrzyk 2	Nastrzyk 3	
0,63	12,60	147337,22	147392,77	147315,00	147348,33
1,25	25,00	289579,33	290414,60	289245,06	289746,33
2,50	50,00	593303,56	592074,66	596375,78	593918,00
3,75	75,00	915001,22	919541,77	913185,00	915909,33
5,00	100,0	1184826,51	1184556,15	1186229,34	1185204,00
6,26	125,20	1490784,66	1493666,00	1493480,86	1492225,33



Rycina 17. Wykres zależności pola powierzchni od stężenia cefepimu dla równania $y=239414x-2982$

Tabela 22. Wyniki pomiarów dla kolejnych stężeń wzorca cefepimu dla równania $y=246336x-3266,9$

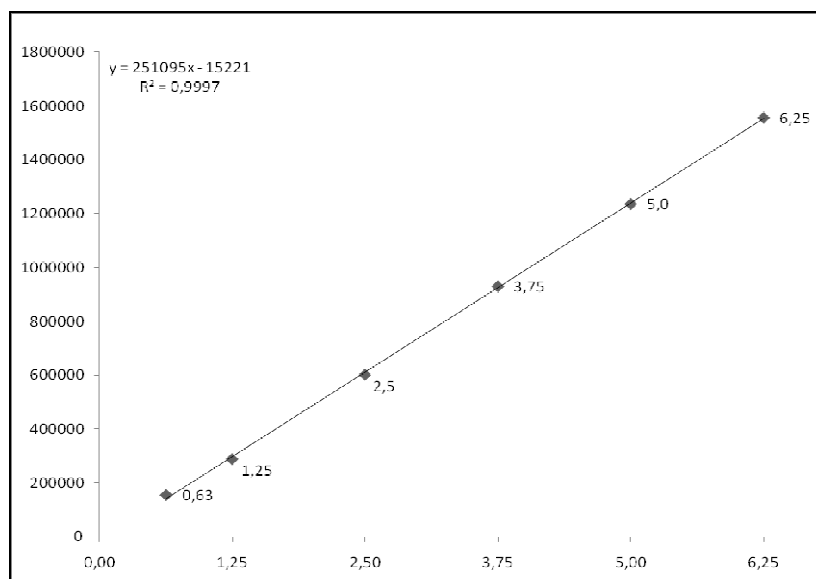
Stężenie wzorca w mg/50ml	Stężenie wzorca w przeliczeniu na $\mu\text{g/ml}$	Pole powierzchni pików cefepimu			Średnia powierzchnia pików uzyskana z trzech prób
		Nastrzyk 1	Nastrzyk 2	Nastrzyk 3	
0,63	12,60	158978,89	157822,42	158414,68	158405,33
1,25	25,00	307355,35	308261,73	304246,22	306621,10
2,5	50,00	605245,55	610002,81	607121,74	607456,70
3,75	75,00	907103,30	912750,16	910049,94	909967,80
5,0	100,00	1224151,51	1230730,15	1228770,34	1227884,00
6,25	125,00	1542344,22	1545928,78	1544020,99	1544098,00



Rycina 18. Wykres zależności pola powierzchni od stężenia cefepimu dla równania $y=246336x-3266,9$

Tabela 23. Wyniki pomiarów dla kolejnych stężeń wzorca cefepimu dla równania $y=251095x-15221$

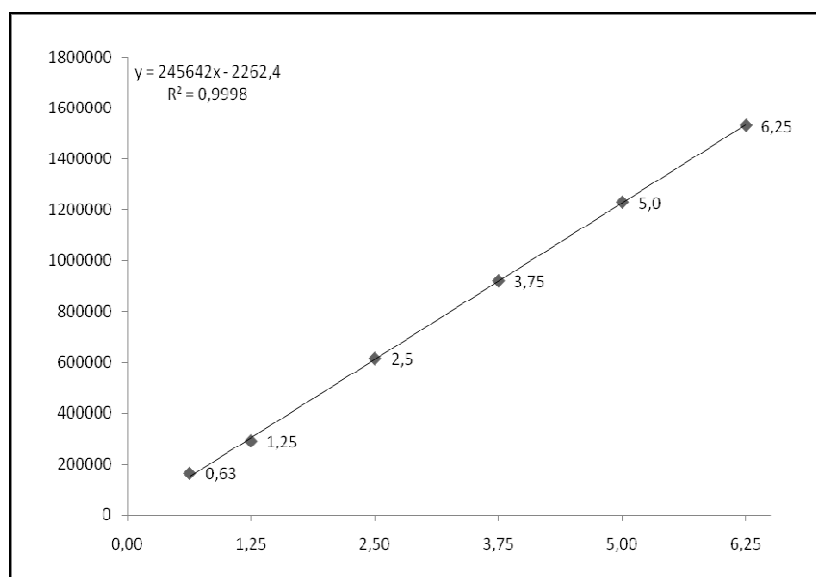
Stężenie wzorca w mg/50ml	Stężenie wzorca w przeliczeniu na µg/ml	Pole powierzchni pików cefepimu			Średnia powierzchnia pików uzyskana z trzech prób
		Nastrzyk 1	Nastrzyk 2	Nastrzyk 3	
0,63	12,60	155586,35	157138,31	155368,34	156031,00
1,25	25,00	287831,08	290514,212	290041,61	289462,30
2,50	50,00	605112,32	598255,28	604656,20	602674,60
3,75	75,00	931185,73	933024,99	930360,10	931523,60
5,00	100,00	1236914,00	1239271,00	1236342,00	1237509,00
6,25	125,00	1556635,87	1558077,42	1558351,61	1557688,30



Rycina 19. Wykres zależności pola powierzchni od stężenia cefepimu dla równania $y=251095x-15221$

Tabela 24. Wyniki pomiarów dla kolejnych stężeń wzorca cefepimu dla równania $y=245642x-2262,4$

Stężenie wzorca w mg/50ml	Stężenie wzorca w przeliczeniu na µg/ml	Pole powierzchni pików cefepimu			Średnia powierzchnia pików uzyskana z trzech prób
		Nastrzyk 1	Nastrzyk 2	Nastrzyk 3	
0,63	12,60	162441,40	162998,89	163797,61	163079,30
1,25	25,00	289720,66	289125,93	291773,21	290206,60
2,50	50,00	616812,70	610798,91	614468,21	614026,60
3,75	75,00	914485,90	923098,69	920725,22	919436,60
5,00	100,00	1222697,21	1233715,85	1230716,94	1229043,33
6,25	125,00	1527102,671	1534443,29	1531973,94	1531173,30



Rycina 20. Wykres zależności pola powierzchni od stężenia cefepimu dla równania $y=245642x-2262,4$

Tabela 25. Ocena statystyczna równań regresji sporządzonych do oznaczeń ilościowych cefepimu w 1% i 5% (w/w) kroplach recepturowych oraz kroplach przygotowanych na rozpuszczalniku do kropli wersji „przemysłowych”

Parametr	Krzywe kalibracyjne			
	$y=239414x-2982$	$y=246336x-3266,9$	$y=251095x-15221$	$y=245642x-2262,4$
Współczynnik kierunkowy prostej - a	239414,234	246336,503	251094,640	245641,922
Błąd standardowy współczynnika kierunkowego prostej S_a	2472,164	1603,421	1037,589	1067,142
Przedział ufności współczynnika kierunkowego prostej ($\alpha = 0,05, f = 4$)	239414,234 $\pm 6862,72$	246336,503 $\pm 4451,09$	251094,640 $\pm 2880,35$	245641,922 $\pm 2962,38$
Współczynnik b	-2981,999	-3266,989	-15220,854	-2262,408
Błąd standardowy współczynnika b S_b	9384,434	6082,245	16698,521	17174,127
Przedział ufności współczynnika b ($\alpha = 0,05, f = 4$)	2981,999 $\pm 26051,180$	3266,989 $\pm 16884,310$	15220,854 $\pm 46355,091$	2262,408 $\pm 47675,370$
Współczynnik korelacji r	$r = 0,9996 > r_{\alpha,f} = 0,8114$ ($\alpha = 0,05, f = 4$) => korelacja istotna	$r = 0,9998 > r_{\alpha,f} = 0,8114$ ($\alpha = 0,05, f = 4$) => korelacja istotna	$r = 0,9997 > r_{\alpha,f} = 0,8114$ ($\alpha = 0,05, f = 4$) => korelacja istotna	$r = 0,9996 > r_{\alpha,f} = 0,8114$ ($\alpha = 0,05, f = 4$) => korelacja istotna
Istotność współczynnika a	$a/S_a = 96,844 > t_{\alpha,f} = 2,776$ ($\alpha = 0,05, f = 4$) => korelacja istotna	$a/S_a = 153,63 > t_{\alpha,f} = 2,776$ ($\alpha = 0,05, f = 4$) => korelacja istotna	$a/S_a = 241,99 > t_{\alpha,f} = 2,776$ ($\alpha = 0,05, f = 4$) => korelacja istotna	$a/S_a = 230,186 > t_{\alpha,f} = 2,776$ ($\alpha = 0,05, f = 4$) => korelacja istotna
Istotność współczynnika b	$b/S_b = 0,317 < t_{\alpha,f} = 2,776$ ($\alpha = 0,05, f = 4$) => korelacja nieistotna	$b/S_b = 0,537 < t_{\alpha,f} = 2,776$ ($\alpha = 0,05, f = 4$) => korelacja nieistotna	$b/S_b = 0,911 < t_{\alpha,f} = 2,776$ ($\alpha = 0,05, f = 4$) => korelacja nieistotna	$b/S_b = 0,132 < t_{\alpha,f} = 2,776$ ($\alpha = 0,05, f = 4$) => korelacja nieistotna
$t_{\alpha f}$	2,776	2,776	2,776	2,776

8.5. Oznaczanie zawartości cefepimu w preparacie Maxipime®inj.

Zawartość cefepimu w każdej serii preparatu Maxipime®inj. została oznaczona metodą wzorca zewnętrznego za pomocą krzywych kalibracyjnych przedstawionych w pkt. 8.4.

W tym celu odważono trzy naważki danej serii preparatu Maxipime®inj., następnie przeniesiono ilościowo do kolb miarowych i uzupełniono wodą do HPLC do wymaganej objętości 100 ml. Próbkę została poddana analizie chromatograficznej metodą krzywych wzorcowych zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 8.8.1. Dla przykładu w tabeli 26 przedstawiono analizę zawartości cefepimu w serii nr 8E37309 preparatu Maxipime®inj., która została wyliczona na podstawie równania: $y=246336x-3266,9$. Zgodnie z obliczeniami 1,0 g preparatu badanej serii zawiera 0,580 g cefepimu w postaci dichlorowodoru cefepimu, czyli 1,0 g dichlorowodoru cefepimu odpowiada 1,723 g Maxipime®inj.

Tabela 26. Oznaczenie zawartości cefepimu w preparacie Maxipime®inj. seria 8E37309

naważka Maxipime® (g)	powierzchnia piku	stężenie cefepimu (%)	zawartość cefepimu w Maxipime® (%)	ilość Maxipime® równoważna 1 g cefepimu
0,08965	637583	0,052031	58,04	1,72295
	637422	0,052017	58,02	1,72354
	637750	0,052044	58,05	1,72265
		średnia	58,04	1,72305
0,12935	922652	0,075142	58,09	1,72147
	922723	0,075181	58,12	1,72058
	923570	0,075175	58,11	1,72087
		średnia	58,11	1,72097
0,17260	1229778	0,100111	58,00	1,72409
	1230100	0,100137	58,01	1,72384
	1229862	0,100118	58,00	1,72397
		średnia	58,00	1,72397

8.6. Tożsamość cefepimu w badaniach trwałości roztworów i kropli

Do badań trwałości cefepimu w kroplach do oczu zastosowano dostępny na polskim rynku farmaceutycznym preparat handlowy: Maxipime®inj. zawierający antybiotyk w postaci dichlorowodoru cefepimu. Ponieważ wykorzystane w pracy serie zostały dopuszczone do obrotu na terenie Polski założono, że producent (Bristol-Myers Squibb) wykonał w tym celu konieczne i określone przez farmakopeę badania tożsamości substancji oraz oznaczenie substancji pokrewnych, w przeciwnym razie oznaczone serie nie byłyby zwolnione do obrotu.

Ponadto w badaniach walidacji metody ilościowego oznaczania cefepimu w roztworach i kroplach przeprowadzono analizę specyficzności, która potwierdza tożsamość antybiotyku (pkt. 8.7.1.).

Tożsamość 1% i 5% kropli z cefepimem we wszystkich wersjach przeanalizowanych w pracy zgodnie z zaleceniami ICH potwierdzona została w czasie badań metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej przy pomocy parametru jakim jest czas retencji (t_R) oraz współczynnik retencji (k). Stałość tych parametrów była monitorowana na każdym etapie badań (Tabele 38-52 i 64-78 oraz Ryciny 26-70 i 81-108).

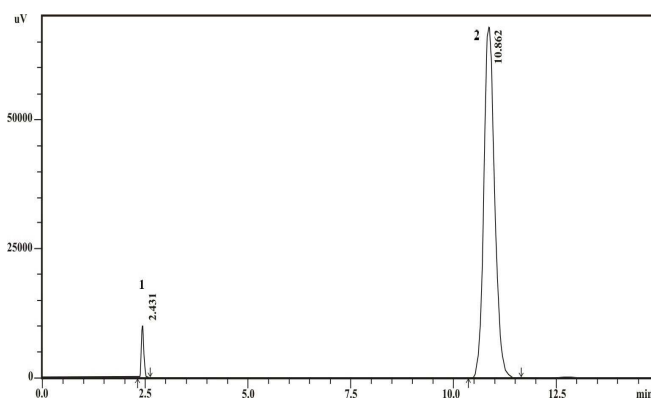
8.7. Walidacja metody HPLC oznaczania cefepimu w 1% i 5% roztworach wodnych oraz kroplach recepturowych i „przemysłowych”

Metoda ilościowego oznaczania cefepimu w roztworach wodnych oraz kroplach do oczu została zwalidowana pod kątem specyficzności, dokładności, precyzji, liniowości oraz elastyczności. Obliczono również granicę wykrywalności oraz granicę oznaczalności [103].

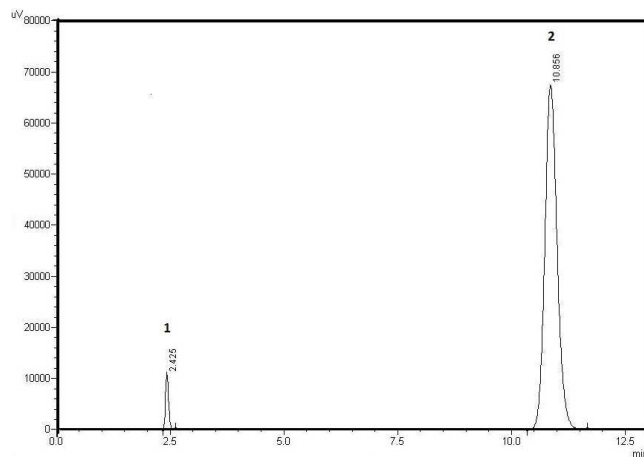
8.7.1. Specyficzność

Celem wykazania specyficzności metody oznaczania cefepimu w kroplach do oczu poddano analizie chromatograficznej wg pkt. 8.8.1. następujące roztwory:

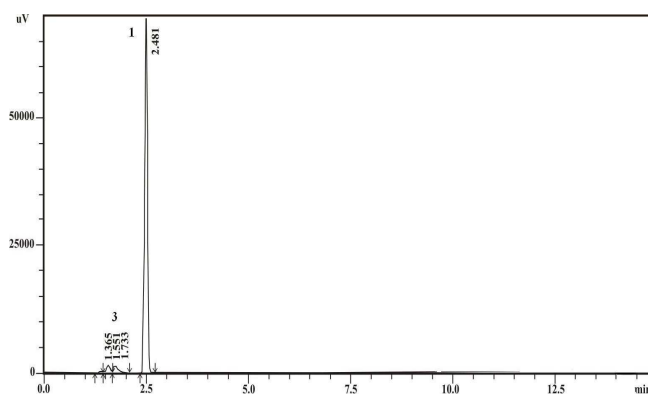
- ⇒ wzorzec chlorowodorku cefepimu (CRS) wg USP 32
- ⇒ roztwór wodny preparatu Maxipime @inj. (dichlorowodorek cefepimu)
- ⇒ krople do oczu placebo, stanowiące roztwór wszystkich substancji pomocniczych zastosowanych 1% i 5% kroplach do oczu z cefepimem. Skład kropli placebo odpowiadał pod względem składu jakościowego i ilościowego substancji pomocniczych wersji 4R 1% kropli do oczu. Do analizy specyficzności dołączono widmo w UV-VIS chlorowodorku cefepimu oraz kropli placebo. Wyniki badań przedstawiono na rycinach 21-25.



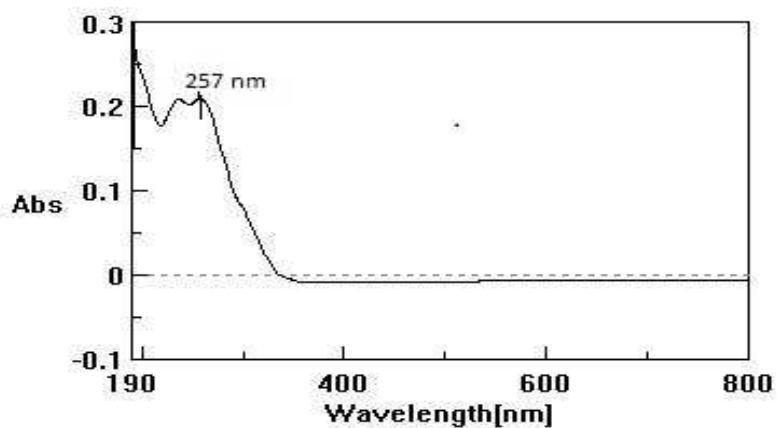
Rycina 21. Chromatogram roztworu wodnego wzorca dichlorowodorku cefepimu (CRS),
1-pik uracylu, 2- pik cefepimu



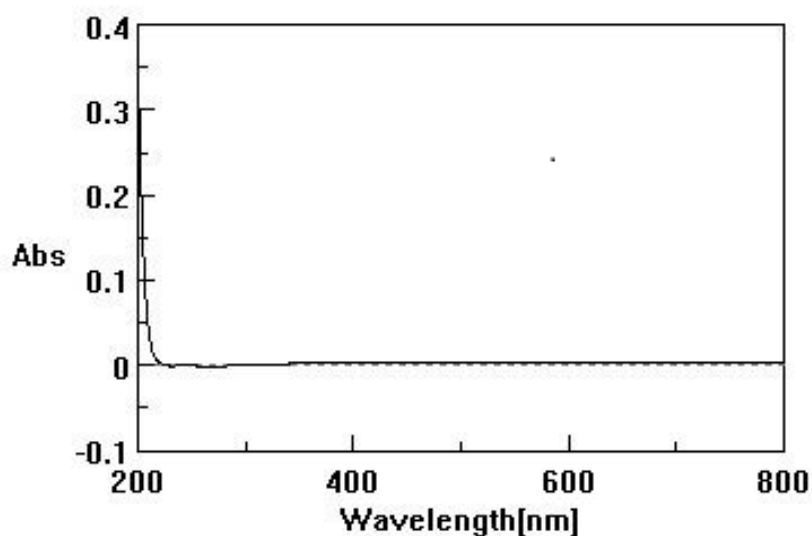
Rycina 22. Chromatogram roztworu wodnego preparatu Maxipime®inj., 1 – pik uracylu, 2– pik cefepimu



Rycina 23. Chromatogram kropli w wersji placebo o składzie jakościowym i ilościowym odpowiadającym wersji nr 4R kropli z 1 % cefepimem, 1 – pik uracylu, 3–składniki kropli placebo



Rycina 24. Widmo UV-Vis dichlorowodorku cefepimu w zakresie długości fali 200 nm – 800 nm. Analityczna długość fali $\lambda_{max} = 257 \text{ nm}$



Rycina 25. Widmo UV-Vis kropli placebo w zakresie długości fali 200 nm – 800 nm

8.7.2. Dokładność

Dokładność i precyzję metody oznaczania ilościowego cefepimu w kroplach wyznaczono poddając analizie mieszaniny modelowe kropli 1% (formulacja nr 1) i kropli 5% (formulacja nr I) (Tabela 13). Mieszaniny modelowe zawierały odpowiednio: 5,0; 7,5; 8,0; 10,0; 12,0; 12,5 mg/ml cefepimu tj. w zakresie 50% -125% przewidywanych wyników analizy 1% kropli oraz 25,0; 37,5; 40,0; 50,0; 60,0; 62,5 mg/ml cefepimu (dla 5% kropli) również w zakresie 50%-125%. Dla każdej mieszaniny modelowej przygotowano po 9 próbek do nastrzyku wg pkt. 8.8.1. Do obliczenia zawartości antybiotyku na podstawie uzyskanych pól powierzchni pików zastosowano krzywą kalibracyjną o wzorze: $y=246336x - 3266,9$. Za miarę dokładności metody przyjęto procent odzysku, który obliczono wg następującego wzoru:

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

Otrzymane wyniki oznaczeń dokładności metody dla kropli 1% i 5% przedstawiono w tabelach 27-32.

8.7.3. Precyzja

Precyzję obliczono na podstawie wyników analizy zawartości cefepimu w próbach przygotowanych w pkt. 8.7.2. Precyzję przedstawiono jako wartość liczbową odchylenia standardowego oraz jako procent względnego odchylenia standardowego, czyli współczynnik zmienności. Wyniki przedstawiono w tabelach 33-34.

Tabela 27. Wyniki analizy dokładności metody ilościowego oznaczania cefepimu w mieszaninach modelowych 0,50% - 0,75% (zakres 50%-75% dla kropli 1%)

Nr próbki	Mieszanina modelowa 0,50%					Mieszanina modelowa 0,75%				
	Pole powierzchni piku cefepimu	Stężenie oznaczone (m/v)	Gęstość mieszaniny modelowej 25°C (g/cm ³)	Stężenie oznaczone (m/m)	Stężenie obliczone (m/m)	Pole powierzchni piku cefepimu	Stężenie oznaczone (m/v)	Gęstość mieszaniny modelowej 25°C (g/cm ³)	Stężenie oznaczone (m/m)	Stężenie obliczone (m/m)
					0,5176					0,7467
					Odzysk %					Odzysk %
1	644290	0,5257	1,0053 ± 0,0001	0,5230	101,04	925109	0,7537	1,0053 ± 0,0001	0,7497	100,40
2	637583	0,5203		0,5176	100,00	922238	0,7514		0,7474	100,09
3	637750	0,5204		0,5176	100,00	923125	0,7521		0,7481	100,19
4	643026	0,5247		0,5219	100,83	922723	0,7518		0,7478	100,15
5	637422	0,5202		0,5174	99,97	922652	0,7517		0,7477	100,13
6	640319	0,5225		0,5197	100,41	923570	0,7525		0,7485	100,24
7	644108	0,5256		0,5228	101,01	923570	0,7525		0,7485	100,24
8	641993	0,5239		0,5211	100,68	923465	0,7524		0,7484	100,23
9	640319	0,5225		0,5197	100,41	923716	0,7526		0,7486	100,25
Średnia	648053	0,5229			0,5201	100,48	923352		0,75232	
S					0,4066					0,0898
Wz %					0,4046					0,0896

Tabela 28. Wyniki analizy dokładności metody ilościowego oznaczania cefepimu w mieszaninach modelowych 0,8%-1,0% (zakres 80%-100% dla kropli 1%)

Nr próbki	Mieszanina modelowa 0,80%					Mieszanina modelowa 1,0%				
	Pole powierzchni piku cefepimu	Stężenie oznaczone (m/v)	Gęstość mieszaniny modelowej 25°C (g/cm ³)	Stężenie oznaczone (m/m)	Stężenie obliczone (m/m)	Pole powierzchni piku cefepimu	Stężenie oznaczone (m/v)	Gęstość mieszaniny modelowej 25°C (g/cm ³)	Stężenie oznaczone (m/m)	Stężenie obliczone (m/m)
					0,7942					0,9926
					Odzysk %					Odzysk %
1	995848	0,8112	1,0060 ± 0,0001	0,8064	101,53	1277144	1,0396	1,0080 ± 0,0001	1,0313	103,90
2	996002	0,8113		0,8065	101,54	1274805	1,0377		1,0295	103,71
3	996425	0,8116		0,8067	101,57	1274591	1,0375		1,0293	103,69
4	992952	0,8088		0,8040	101,23	1274084	1,0371		1,0289	103,65
5	989996	0,8064		0,8016	100,93	1278509	1,0407		1,0324	104,01
6	985432	0,8027		0,7979	100,46	1277444	1,0398		1,0315	103,92
7	992154	0,8082		0,8034	101,16	1275367	1,0381		1,0299	103,75
8	993584	0,8093		0,8045	101,29	1276321	1,0389		1,0306	103,83
9	988969	0,8056		0,8007	100,82	1275775	1,0384		1,0301	103,77
Średnia	992374	0,8084		0,8036	101,17	1276004	1,0386		1,0303	103,80
S					0,3541					0,1201
Wz %					0,3500					0,1157

Tabela 29. Wyniki analizy dokładności metody ilościowego oznaczania cefepimu w mieszaninach modelowych 1,20% do 1,25% (zakres 120%-125% dla kropli 1%)

Nr próbki	Mieszanina modelowa 1,20%					Mieszanina modelowa 1,25%				
	Pole powierzchni piku cefepimu	Stężenie oznaczone (m/v)	Gęstość mieszaniny modelowej 25°C (g/cm ³)	Stężenie oznaczone (m/m)	Stężenie obliczone (m/m)	Pole powierzchni piku cefepimu	Stężenie oznaczone (m/v)	Gęstość mieszaniny modelowej 25°C (g/cm ³)	Stężenie oznaczone (m/m)	Stężenie obliczone (m/m)
					1,1889					1,2394
					Odzysk %					Odzysk %
1	1490053	1,2124	1,0083 ± 0,0001	1,2024	101,13	1562172	1,2710	1,0085 ± 0,0001	1,2602	101,67
2	1482765	1,2065		1,1966	100,64	1571697	1,2787		1,2679	102,29
3	1483954	1,2075		1,1976	100,73	1564698	1,2730		1,2622	101,84
4	1479956	1,2042		1,1943	100,45	1550213	1,2613		1,2506	100,90
5	1486363	1,2094		1,1994	100,88	1570942	1,2781		1,2673	102,25
6	1475633	1,2007		1,1908	100,15	1572132	1,2791		1,2683	102,33
7	1495101	1,2165		1,2065	101,48	1572365	1,2792		1,2684	102,34
8	1496695	1,2178		1,2077	101,58	1568975	1,2765		1,2657	102,12
9	1489975	1,2124		1,2024	101,13	1566918	1,2748		1,2640	102,00
Średnia	1486722	1,2097			1,1997	100,91	1566679		1,2676	
S					0,4698					0,4322
Wz %					0,4655					0,4237

Tabela 30. Wyniki analizy dokładności metody ilościowego oznaczania cefepimu w mieszaninach modelowych 2,5% -3,75% (zakres 50%-75% dla kropli 5%)

Nr próbki	Mieszanina modelowa 2,5%					Mieszanina modelowa 3,75%				
	Pole powierzchni piku cefepimu	Stężenie oznaczone (m/v)	Gęstość mieszaniny modelowej 25°C (g/cm ³)	Stężenie oznaczone (m/m)	Stężenie obliczone (m/m)	Pole powierzchni piku cefepimu	Stężenie oznaczone (m/v)	Gęstość mieszaniny modelowej 25°C (g/cm ³)	Stężenie oznaczone (m/m)	Stężenie obliczone (m/m)
					2,4810					3,7190
					Odzysk %					Odzysk %
1	634828	2,5903	1,0076 ± 0,0001	2,5707	103,61	903517	3,6811	1,0080 ± 0,0001	3,6518	98,19
2	633926	2,5867		2,5671	103,47	903099	3,6794		3,6502	98,15
3	635238	2,5920		2,5724	103,68	903554	3,6812		3,6520	98,19
4	634560	2,5893		2,5698	103,57	903138	3,6795		3,6503	98,15
5	634253	2,5880		2,5684	103,52	902677	3,6777		3,6485	98,10
6	635144	2,5916		2,5720	103,67	904124	3,6836		3,6543	98,26
7	636121	2,5956		2,5760	103,83	901898	3,6745		3,6453	98,01
8	633793	2,5861		2,5666	103,45	901972	3,6748		3,6456	98,03
9	635098	2,5914		2,5718	103,66	901510	3,6729		3,6437	97,98
Średnia	634773	2,5901			2,5705	103,61	902832,11		3,6783	
S					0,1195					0,0944
Wz %					0,1153					0,0962

Tabela 31. Wyniki analizy dokładności metody ilościowego oznaczania cefepimu w mieszaninach modelowych 4,0% -5,0% (zakres 80%-100% dla kropli 5%)

Nr próbki	Mieszanina modelowa 4,0%					Mieszanina modelowa 5,0%				
	Pole powierzchni piku cefepimu	Stężenie oznaczone (m/v)	Gęstość mieszaniny modelowej 25°C (g/cm ³)	Stężenie oznaczone (m/m)	Stężenie obliczone (m/m)	Pole powierzchni piku cefepimu	Stężenie oznaczone (m/v)	Gęstość mieszaniny modelowej 25°C (g/cm ³)	Stężenie oznaczone (m/m)	Stężenie obliczone (m/m)
					3,8212					5,0647
					Odzysk %					Odzysk %
1	991598	4,0386	1,0083 ± 0,0001	4,0053	104,81	1259564	5,1265	1,0085 ± 0,0001	5,0833	100,36
2	991798	4,0395		4,0062	104,84	1275770	5,1923		5,1485	101,65
3	996568	4,0588		4,0253	105,34	1266437	5,1544		5,1109	100,91
4	980847	3,9950		3,9621	103,68	1285575	5,2320		5,1879	102,43
5	986566	4,0182		3,9851	104,28	1287498	5,2399		5,1957	102,58
6	984574	4,0101		3,9770	104,07	1281537	5,2157		5,1717	102,11
7	992531	4,0424		4,0091	104,91	1283905	5,2253		5,1812	102,30
8	989253	4,0291		3,9959	104,57	1268644	5,1633		5,1198	101,08
9	985638	4,0144		3,9813	104,19	1258916	5,1238		5,081	100,32
Średnia	988819	4,0274			3,9941	104,52	1274205		5,1858	
S					0,5109					0,8857
Wz %					0,4888					0,8723

Tabela 32. Wyniki analizy dokładności metody ilościowego oznaczania cefepimu w mieszaninach modelowych 6,0% -6,25% (zakres 100%-125% dla kropli 5%)

Nr próbki	Mieszanina modelowa 6,0%					Mieszanina modelowa 6,25%				
	Pole powierzchni piku cefepimu	Stężenie oznaczone (m/v)	Gęstość mieszaniny modelowej 25°C (g/cm ³)	Stężenie oznaczone (m/m)	Stężenie obliczone (m/m)	Pole powierzchni piku cefepimu	Stężenie oznaczone (m/v)	Gęstość mieszaniny modelowej 25°C (g/cm ³)	Stężenie oznaczone (m/m)	Stężenie obliczone (m/m)
					6,0321					6,1156
					Odzysk %					Odzysk %
1	1505352	6,1242	1,0091 ± 0,0001	6,0689	100,61	1550172	6,3062	1,0092 ± 0,0001	6,2487	102,17
2	1513408	6,1569		6,1014	101,14	1551162	6,3102		6,2527	102,24
3	1516967	6,1714		6,1157	101,38	1550596	6,3079		6,2504	102,20
4	1515050	6,1636		6,1080	101,26	1546014	6,2893		6,2320	101,90
5	1491089	6,0663		6,0116	99,66	1551852	6,3130		6,2554	102,28
6	1489311	6,0591		6,0044	99,54	1547541	6,2955		6,2381	102,00
7	1500536	6,1047		6,0496	100,29	1543674	6,2798		6,2225	101,74
8	1492632	6,0726		6,0178	99,76	1548601	6,2998		6,2423	102,07
9	1493100	6,0745		6,0197	99,79	1551631	6,3121		6,2545	102,27
Średnia	1501938	6,1104		6,0552	100,38	1549027	6,3015		6,2441	102,10
S					0,6967					0,1752
Wz %					0,6940					0,1716

Tabela 33. Wyniki analizy precyzji metody ilościowego oznaczania cefepimu w mieszaninach modelowych 0,5%-1,25% (dla kropli 1%)

Parametry oceny statystycznej	Oznaczone stężenie cefepimu w mieszaninach modelowych (m/m)					
	0,5%	0,75%	0,8%	1,0%	1,2%	1,25%
Oznaczone stężenie cefepimu (%)	0,5230	0,7497	0,8064	1,0313	1,2024	1,2602
	0,5176	0,7474	0,8065	1,0295	1,1966	1,2679
	0,5176	0,7481	0,8067	1,0293	1,1976	1,2622
	0,5219	0,7478	0,8040	1,0289	1,1943	1,2506
	0,5174	0,7477	0,8016	1,0324	1,1994	1,2673
	0,5197	0,7485	0,7979	1,0315	1,1908	1,2683
	0,5228	0,7485	0,8034	1,0299	1,2065	1,2684
	0,5211	0,7484	0,8045	1,0306	1,2077	1,2657
	0,5197	0,7486	0,8007	1,0301	1,2024	1,2640
X średnie	0,5201	0,7483	0,8036	1,0303	1,1997	1,2569
S	0,002237	0,000671	0,002994	0,001155	0,00556	0,005743
2S	0,004475	0,001342	0,005988	0,002310	0,011119	0,011486
S_x średnie	0,001877	0,000489	0,002331	0,000943	0,004449	0,004119
μ	0,5204 ± 0,001719	0,7483 ± 0,00515	0,8036 ± 0,002301	1,0303 ± 0,000888	1,1997 ± 0,004273	1,2569 ± 0,004414
Wz (%)	0,4301	0,0890	0,3725	0,1121	0,4634	0,4569
n	9	9	9	9	9	9
f=n-1	8	8	8	8	8	8
t α,f	2,306	2,306	2,306	2,306	2,306	2,306

Tabela 34. Wyniki analizy precyzji metody ilościowego oznaczania cefepimu w mieszaninach modelowych 2,5%-6,25% (dla kropli 5%)

Parametry oceny statystycznej	Oznaczone stężenie cefepimu w mieszaninach modelowych (m/m)					
	2,5%	3,75%	4,0%	5,0%	6,0%	6,25%
Oznaczone stężenie cefepimu (%)	2,5707	3,6518	4,0053	5,0833	6,0689	6,2487
	2,5671	3,6502	4,0062	5,1485	6,1014	6,2527
	2,5724	3,6520	4,0253	5,1109	6,1157	6,2504
	2,5698	3,6503	3,9621	5,1879	6,1080	6,2320
	2,5684	3,6485	3,9851	5,1957	6,0116	6,2554
	2,5720	3,6543	3,9770	5,1717	6,0044	6,2381
	2,5760	3,6453	4,0091	5,1812	6,0496	6,2225
	2,5666	3,6456	3,9959	5,1198	6,0178	6,2423
	2,5718	3,6437	3,9813	5,0810	6,0197	6,2545
X średnie	2,5705	3,6490	3,9941	5,1422	6,0552	6,2441
S	0,002947	0,003564	0,019477	0,04483	0,044640	0,010661
2S	0,005895	0,007127	0,038954	0,08966	0,089281	0,021322
S_x średnie	0,002274	0,002936	0,015795	0,038642	0,038459	0,003553
μ	2,5705 ± 0,002265	3,6490 ± 0,002739	3,9941 ± 0,014970	5,1422 ± 0,034460	6,0552 ± 0,034313	6,2441 ± 0,008184
Wz (%)	0,1146	0,0977	0,4876	0,8718	0,7372	0,1707
n	9	9	9	9	9	9
f=n-1	8	8	8	8	8	8
t α,f	2,306	2,306	2,306	2,306	2,306	2,306

8.7.4. Liniowość metody

Liniowość metody została potwierdzona dla wszystkich krzywych kalibracyjnych zastosowanych w oznaczeniach ilościowych metodą wzorca zewnętrznego. Dla każdej krzywej kalibracyjnej metoda jest liniowa w zakresie 12,60 µg/ml do 125,20 µg/ml (pkt. 8.4.) (Tabele 21-25 oraz Ryciny 17-20).

8.7.5. Granica wykrywalności (DL)

Granice wykrywalności (DL – Detection Limit) wyznaczono na podstawie odchylenia standardowego i współczynnika kierunkowego każdej z czterech wyznaczonych krzywych kalibracyjnych. W tym celu zastosowano wzór:

$$DL = 3,3 \cdot \frac{S_y}{a}$$

S_y - rozrzut wartości **y** wyliczonych z krzywej kalibracyjnej

a - współczynnik regresji krzywej kalibracyjnej

Podsumowanie wartości DL wyznaczonych dla wszystkich krzywych kalibracyjnych przedstawiono w tabeli 35.

8.7.6. Granica oznaczalności (QL)

Granice oznaczalności (QL – Quantitation Limit) wyznaczono analogicznie jak granice wykrywalności. Do obliczeń zastosowano wzór uwzględniający również te same parametry krzywej kalibracyjnej jak w pkt. 8.7.5. W określeniu wartości granicy oznaczalności zastosowano współczynnik 10.

$$QL = 10 \cdot \frac{S_y}{a}$$

Podsumowanie wartości QL wyznaczonych dla wszystkich krzywych kalibracyjnych przedstawiono również w tabeli 35. Poniżej przedstawiono przykładowe obliczenia wartości LD i LQ wykonane na podstawie krzywej $y = 246336x - 3266,9$, gdzie :

$$a = 246336,503$$

$$S_y = 7811,969$$

Otrzymaną wartość wyliczono w mg/50ml. W przeliczeniu na $\mu\text{g/ml}$ **LD** dla cefepimu wynosi $2,093\mu\text{g/ml}$, natomiast **LQ** wynosi $6,340\mu\text{g/ml}$.

Tabela 35. Równania regresji zastosowane w badaniach oraz odpowiadające im wartości LD i LQ

Równania regresji zastosowane w badaniach zawartości kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych i „przemysłowych” (pkt.8.4.)	LD	LQ
$y=239414x-2982$	$3,30\mu\text{g/ml}$	$10,00\mu\text{g/ml}$
$y=246336x-3266,9$	$2,09\mu\text{g/ml}$	$6,34\mu\text{g/ml}$
$y=251095x-15221$	$2,30\mu\text{g/ml}$	$6,97\mu\text{g/ml}$
$y=245642x-2262,4$	$2,42\mu\text{g/ml}$	$7,33\mu\text{g/ml}$

8.7.7. Elastyczność metody

Elastyczność (Robustness) metody zbadano poprzez:

1. Wprowadzenie nieznacznych ilościowych celowych zmian w składzie eluenta (zmiana składu fazy ruchomej bufor: acetonitryl (pkt. 8.4.) 94 : 5,7; 94:6,0; 94:6,3
2. Wprowadzenie zaplanowanych zmian temperatury kolumny (23°C ; 25°C , 27°C).
3. Ponieważ w czasie przechowywania nie stwierdzono zmian pH w składzie części nieorganicznej eluenta, ocena wpływu pH na stałość parametrów analizy została pominięta.

Dokonując oceny elastyczności metody określono stałość parametrów analizy chromatograficznej takich jak: czas retencji, współczynnik ogonowania, ilość pól teoretycznych oraz dokładność i precyzja oznaczania zawartości cefepimu w badanej próbce. Wyniki analizy elastyczności metody uzyskano w oparciu o obliczenia wg krzywej $y=246336x-3266,9$. Zastosowane parametry analizy oraz uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 36.

Tabela 36. Wyniki analizy elastyczności ilościowej metody oznaczania cefepimu w roztworach wodnych i kroplach do oczu

Nowe parametry: skład eluenta i temperatura	Czas retencji [min]	Powierzchnia piku	Współczynnik ogonowania $T_{F 5\%}$	Liczba pólerek teoretycznych na metr	Dokładność (%)	Zawartość (g/100ml)
Bufor:Acetonitryl (94:5,7) 25°C	12,174	1277586	1,092	31071,2	103,8	1,0399
	12,156	1277459	1,096	51918,4	103,79	1,0398
	12,252	1275367	1,081	53145,8	103,62	1,0381
	12,260	1276321	1,082	53349,6	103,7	1,0389
	12,240	1275678	1,080	53354,6	103,65	1,0384
	12,252	1275775	1,083	53395,1	103,65	1,0385
średnia	12,222	1276364,3	1,086	49372,5	103,702	1,0389
S						0,0007
RSD						0,0742
Bufor:Acetonitryl (94:6) 25°C	10,831	1277144	1,088	52626,9	103,81	1,0396
	10,826	1274805	1,094	52744,3	103,58	1,0377
	10,832	1274591	1,097	52752,4	103,56	1,0379
	10,816	1274084	1,100	52635,6	103,52	1,0371
	10,807	1278509	1,103	52393,5	104,48	1,0407
	10,809	1277444	1,103	52456,9	103,79	1,0398
średnia	10,818	1275886,6	1,099	52596,6	103,790	1,0387
S						0,0015
RSD						0,1429
Bufor:Acetonitryl (94:6) 27°C	10,316	1275885	1,102	56092,1	103,72	1,0385
	10,321	1274142	1,100	56013,3	103,66	1,0371
	10,326	1274846	1,100	56117,7	103,58	1,0377
	10,319	1271991	1,103	55894,6	103,35	1,0354
	10,319	1276029	1,102	55974,6	103,67	1,0387
	10,317	1276543	1,104	56016,2	103,72	1,0391
średnia	10,320	1274710,2	1,102	56003,3	103,616	1,0377
S						0,0014
RSD						0,1308
Bufor:Acetonitryl (94:6) 23°C	11,419	1270726	1,155	47131,5	103,42	1,0344
	11,410	1270073	1,170	47454,5	103,19	1,0338
	11,411	1269432	1,156	47046,7	103,14	1,0333
	11,420	1271016	1,164	46997,5	103,26	1,0345
	11,409	1269736	1,160	46967,5	103,24	1,0336
	11,420	1273252	1,164	46840,5	103,45	1,0364
średnia	11,415	1270705,8	1,161	47073,1	103,378	1,0343
S						0,0011
RSD						0,1084
Bufor:Acetonitryl (94:6,3) 25°C	9,388	1272960	1,138	50390,9	103,51	1,0362
	9,391	1271768	1,130	50567,9	103,33	1,0352
	9,384	1269763	1,140	55337,9	103,17	1,0336
	9,388	1272543	1,145	51234,9	103,39	1,0358
	9,384	1274379	1,140	55337,3	103,16	1,0335
	9,389	1274379	1,141	50491,3	103,54	1,0373
średnia	9,473	1272067,8	1,139	51616,5	103,461	1,0354
S						0,0013
RSD						0,1260

8.8. Analiza stężenia cefepimu w 1% i 5% (w/w) wodnych roztworach, w 1% i 5% kroplach recepturowych oraz w 1% i 5% kroplach „przemysłowych” świeżo sporządzonych i w czasie przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C

Zmiany zawartości cefepimu w roztworach wodnych oraz w kroplach recepturowych i „przemysłowych” były prowadzone przez okres 30 dni. W tym czasie roztwory i krople przechowywano w chłodziarkach farmaceutycznych MED-288 bez dostępu światła w temperaturze 4°C i 20°C. Badania roztworów i kropli w temperaturze 20°C były przeprowadzone w celach porównawczych. Próbki do badań zmian zawartości od dnia sporządzenia roztworów i kropli były pobierane w warunkach aseptycznych w trzydniowych odstępach. Do analizy zmian stężenia cefepimu w roztworach i kroplach recepturowych oraz „przemysłowych” zastosowano zwalidowaną w pkt. 8.7. metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Stężenie cefepimu w próbce każdorazowo zostało wyznaczone metodą wzorca zewnętrznego.

8.8.1. Tok analityczny

Do oddzielnych trzech kolb miarowych pojemności 50 ml pobierano przy pomocy pipety półautomatycznej po 500 µl 1% kropli oraz po 250 µl kropli 5%. Do każdej próbki dodawano po 100 µl roztworu wodnego uracylu o stężeniu 0,4 g/l. Uracyl stosowano jako marker w celu wyznaczenia czasu martwego (t_0) analizy i obliczenia współczynnika retencji k dla cefepimu. Objętość kolb uzupełniono wodą do HPLC. Po wymieszaniu roztwory przesączono przez sączonek membranowy o średnicy porów 0,45 µm do wialek 1,5 ml. Wialki umieszczono w autosamplerze. Z każdej z trzech wialek wykonywano po jednym nastrzyku (10 µl dla 1% kropli), (5 µl dla kropli 5%). Na podstawie zarejestrowanych pól powierzchni pików obliczono z równania krzywych kalibracyjnych stężenie cefepimu w analizowanych 1% i 5% roztworach wodnych oraz w 1% i 5% kroplach wersji recepturowych i „przemysłowych”. Równania regresji zastosowane do oznaczania cefepimu w roztworach wodnych i w poszczególnych wersjach 1% i 5% kropli recepturowych oraz „przemysłowych” przytoczono w tabeli 20.

Stężenie cefepimu w % (g/100ml) obliczono ze wzoru:

$$x \% = \frac{(y+b) \cdot k}{a} \text{ gdzie:}$$

x - stężenie cefepimu w kroplach lub wodnych roztworach w % (g/100ml)

y - pole powierzchni piku na chromatogramie

a - współczynnik kierunkowy krzywej wzorcowej

b - współczynnik liczbowy określający wielkość przesunięcia krzywej wzorcowej względem punktu przecięcia na osi y

k - współczynnik wynikający z rozcieńczeń dla kropli 1% $k = 0,2$.

Dla kropli 5% nie uwzględnia się współczynnika k we wzorze do obliczeń stężenia % cefepimu.

Przykład obliczenia zawartości cefepimu w świeżo sporządzonych 1% kroplach do oczu wersji nr 4aR. Dane do obliczeń:

$$y = 1265962$$

$$a = 239414$$

$$b = 2982$$

$$k = 0,2$$

$$x \% = \frac{(1265962+2982) \cdot 0,2}{239414} = 1,060 \text{ g/100 ml}$$

8.8.2. Parametry analizy chromatograficznej

W czasie trwania analizy zmian zawartości cefepimu w 1% i 5% kroplach do oczu w wersjach recepturowych i „przemysłowych” wyznaczano następujące parametry rozdziału chromatograficznego [103,132]:

- Czas retencji t_R (Ret. time)
- Współczynnik retencji k (k')
- Pole powierzchni piku A (Area)
- Ilość pól teoretycznych na metr N/m (Theoretical Plate)
- Rozdzielczość R_S (Resolution)
- Współczynnik ogonowania $T_{F5\%}$ (Tailing factor).

Wyniki zestawionow tabeli 37.

Tabela 37. Parametry rozdziału chromatograficznego wyznaczone dla cefepimu w 1 % i 5 % (w/w) kroplach wersji recepturowych: nr 4R i IVR oraz kroplach „przemysłowych” wersji 4P i IVP świeżo sporządzonych oraz podczas przechowywania w temperaturze 4°C

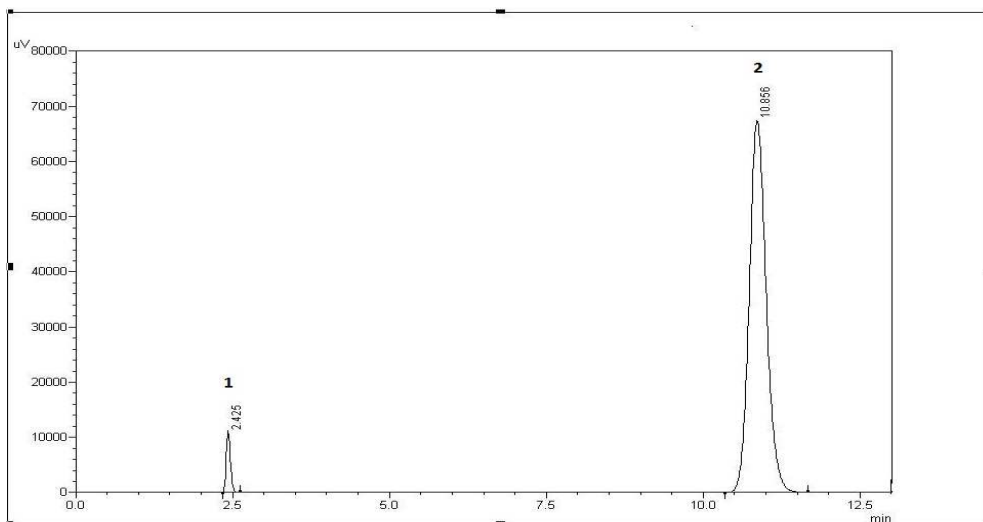
Nr ryciny	Czas retencji (t _R) [min]	Współczynnik Retencji (k)	Pole Powierzchni Piku Cefepimu (A)	Półki teoretyczne na metr (N/m)	Rozdzielczość (Rs)	Współczynnik Ogonowania (T _{F5%})
Rycina 41	10,969	3,47	1237833	30473,048	22,796	1,150
Rycina 42	10,916	3,41	1102711	29214,740	11,963	1,145
Rycina 43	10,932	3,41	663251	29502,232	8,854	1,144
Rycina 62	10,976	3,48	1216826	27838,876	25,893	1,180
Rycina 63	11,007	3,49	985294	75099,66	10,913	1,183
Rycina 64	10,970	3,43	309022	29288,868	8,587	1,144
Rycina 87	10,986	3,37	1296758	37765,460	24,145	1,215
Rycina 88	10,719	3,26	1047125	39235,444	11,494	1,215
Rycina 93	10,971	3,45	1265783	37736,086	23,222	1,214
Rycina 94	10,725	3,31	911294	39327,951	11,206	1,216
Rycina 101	10,703	3,26	1294976	36267,671	20,311	1,220
Rycina 102	10,592	3,19	1113513	38672,125	11,175	1,222
Rycina 107	10,615	3,27	1287869	37660,377	23,675	1,216
Rycina 108	10,872	3,34	1067600	39231,360	11,078	1,216

8.8.3. Wyniki badań stężenia cefepimu w 1% i 5% wodnych roztworach, w 1% i 5% kroplach recepturowych oraz w 1% i 5% kroplach „przemysłowych” świeżo sporządzonych i w czasie przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C

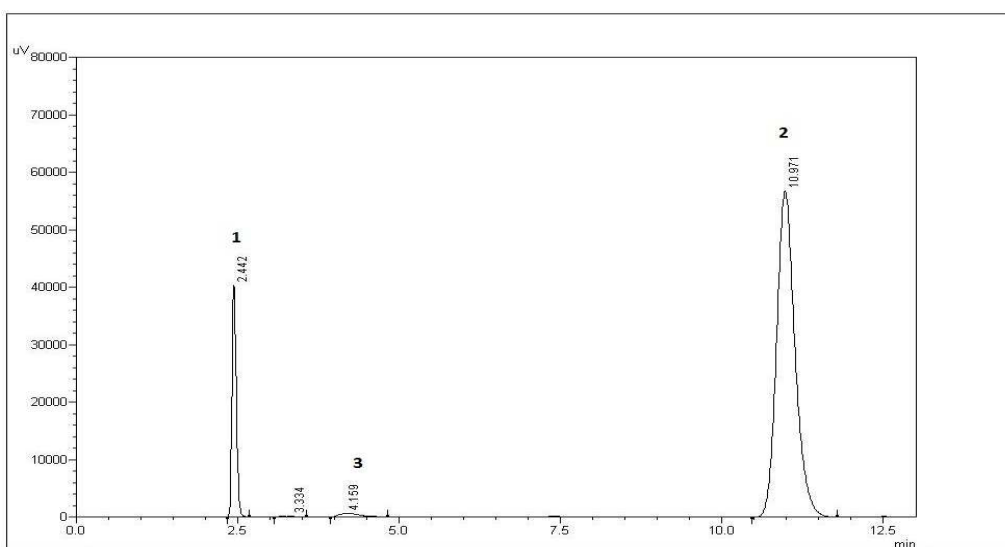
- Wyniki badań stężenia cefepimu w 1% wodnych roztworach i w 1% kroplach do oczu wersji recepturowych przytoczono w tabelach 38-44 oraz na rycinach 26-46.
- Wyniki badań stężenia cefepimu w 5% wodnych roztworach i w 5% kroplach do oczu wersji recepturowych przytoczono w tabelach 45-52 oraz na rycinach 47-70.
- Wyniki badań stężenia cefepimu w 1% i 5% kroplach „przemysłowych” przytoczono w tabelach 64-77 i na rycinach 81-108.

Tabela 38. Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 1% roztworach wodnych (0₁%) świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną

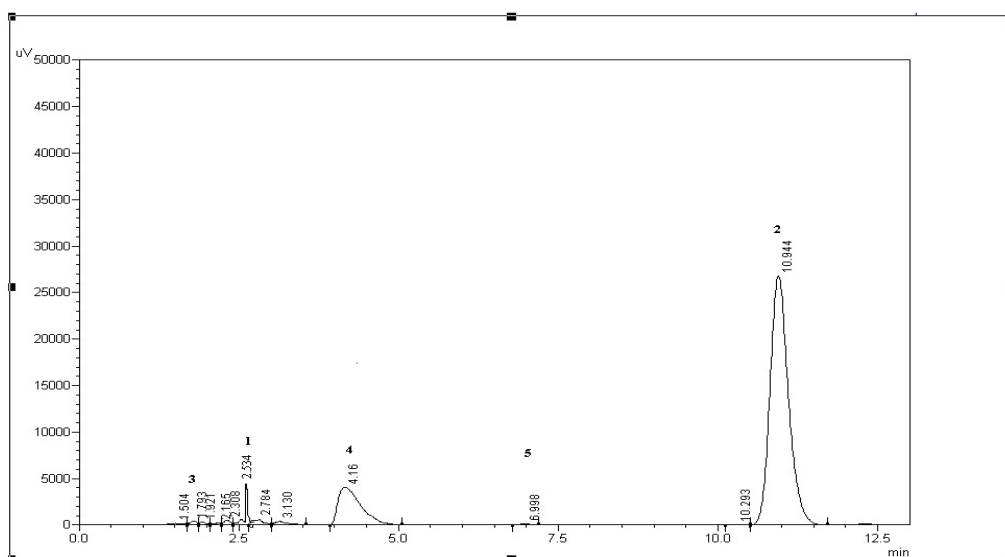
1% roztwory wodne dichlorowodoru cefepimu (0 ₁ %), średnia dla serii 1 i serii 2							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)	Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml] (n=6)	Zmiana zawartości ± SD (%)
0	1268400±7917	1,062±0,142	100,00	0	1266805±1740	1,061±0,094	100,00
3	1266805±1740	1,061±0,094	99,87±0,05	3	1200415±3476	1,005±0,504	94,77±0,39
6	1224833±4985	1,026±1,043	96,57±1,24	6	1099292±4917	0,921±0,135	86,81±0,20
9	1211634±4522	1,015±0,379	95,54±0,49	9	1039346±4648	0,871±0,662	82,09±0,47
12	1192290±2255	0,998±1,060	94,01±1,09	12	957002±3107	0,802±0,305	75,60±1,67
15	1191852±2867	0,998±1,162	93,98±1,19	15	865808±3381	0,726±0,966	68,42±1,02
18	1171275±1233	0,981±1,022	92,36±1,12	18	777103±3069	0,652±0,152	61,43±0,71
21	1159542±2307	0,971±1,070	91,44±1,06	21	664703±1027	0,558±1,056	52,58±0,60
24	1151005±3630	0,964±0,882	90,77±0,93	24	599800±4029	0,504±1,050	47,47±0,74
27	1125690±2102	0,943±0,151	88,78±0,26	27	516315±471	0,434±0,238	40,90±0,74
30	1122164±2051	0,940±0,284	88,50±0,12	30	496237±493	0,417±0,181	39,32±0,75



Rycina 26. Chromatogram świeżo sporządzonego 1% wodnego roztworu cefepimu (0.1%)
1- uracyl, 2- cefepim



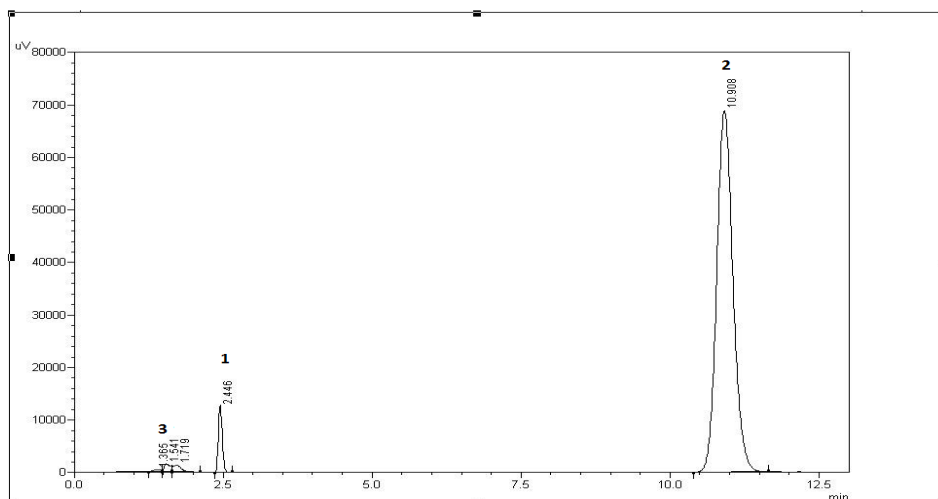
Rycina 27. Chromatogram 1% wodnego roztworu cefepimu (0.1%) po 30 dniach przechowywania
w temp. 4°C.
1- uracyl, 2- cefepim, 3- produkt rozkładu cefepimu



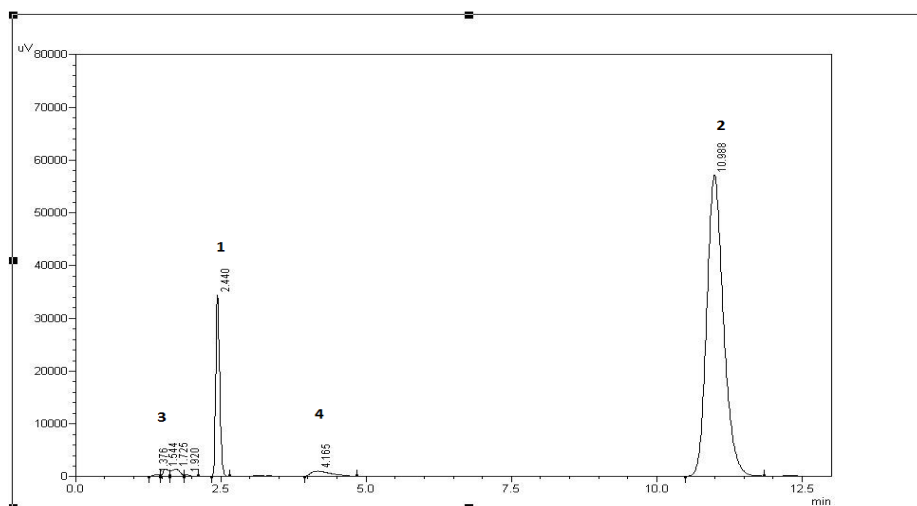
Rycina 28. Chromatogram 1% wodnego roztworu cefepimu (0.1%) po 30 dniach przechowywania
w temp. 20°C.
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4-5- produkty rozkładu cefepimu

Tabela 39. Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 1% recepturowych kroplach do oczu wersji nr 1R świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną

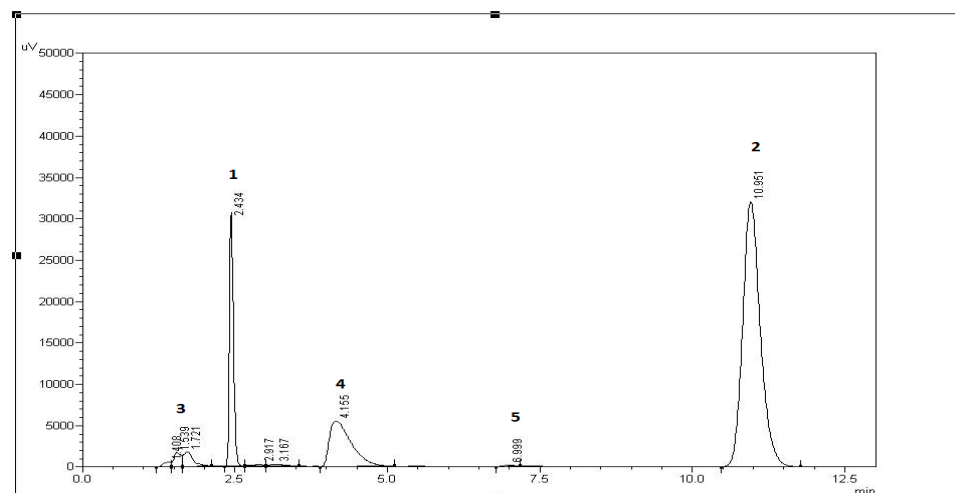
Krople recepturowe wersji 1R, średnia dla serii 1 i serii 2							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pikru cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)	Dzień	Średnie pole powierzchni pikru cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)
0	1273229±627	1,066±0,000	100,00±0,00	0	1273229±627	1,066±0,000	100,00
3	1249010±12039	1,046±0,760	98,10±0,75	3	1243913±1554	1,042±1,814	97,70±1,77
6	1240738±1488	1,039±0,685	97,45±0,67	6	1119682±4524	0,938±0,417	87,97±0,37
9	1234052±5076	1,033±0,269	96,93±0,26	9	1069909±4359	0,896±0,369	84,07±0,31
12	1227544±1454	1,028±0,109	96,42±0,10	12	997597±6227	0,836±0,620	78,40±0,49
15	1202424±7501	1,007±0,566	94,45±0,53	15	934048±4738	0,783±0,411	73,42±0,30
18	1184875±2902	0,992±1,000	93,08±0,93	18	870573±1203	0,730±0,174	68,45±0,12
21	1179625±2422	0,988±0,367	92,67±0,34	21	806510±2066	0,676±0,149	63,43±0,09
24	1162142±8838	0,973±1,210	91,30±1,10	24	775212±2036	0,650±0,355	60,98±0,22
27	1149457±3517	0,963±0,134	90,30±0,12	27	734657±2071	0,616±6,234	57,80±3,60
30	1138734±1961	0,954±0,245	89,46±0,22	30	640989±2282	0,538±0,559	50,46±0,28



Rycina 29. Chromatogram świeżo sporządzonych 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 1R.
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego



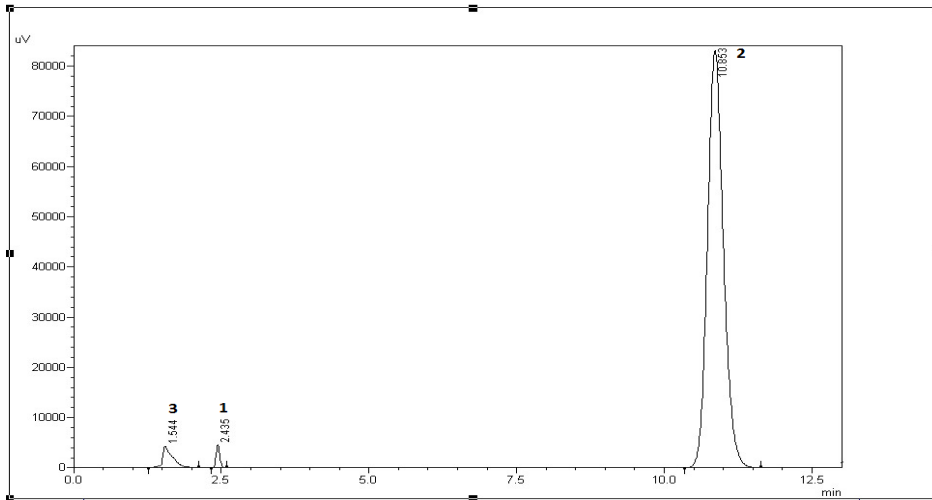
Rycina 30. Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 1R po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu



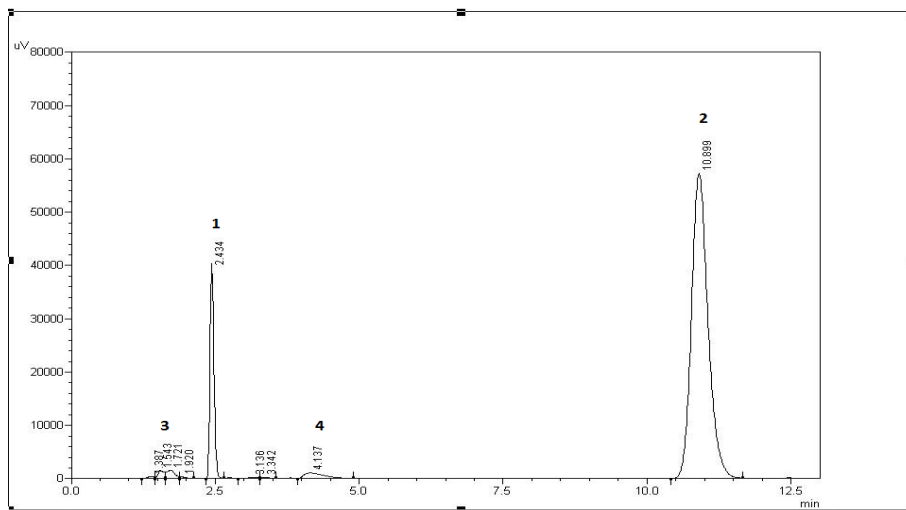
Rycina 31. Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 1R po 30 dniach przechowywania w temp. 20°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4-5- produkty rozkładu cefepimu

Tabela 40. Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 1% recepturowych kroplach do oczu wersji nr 2R świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną

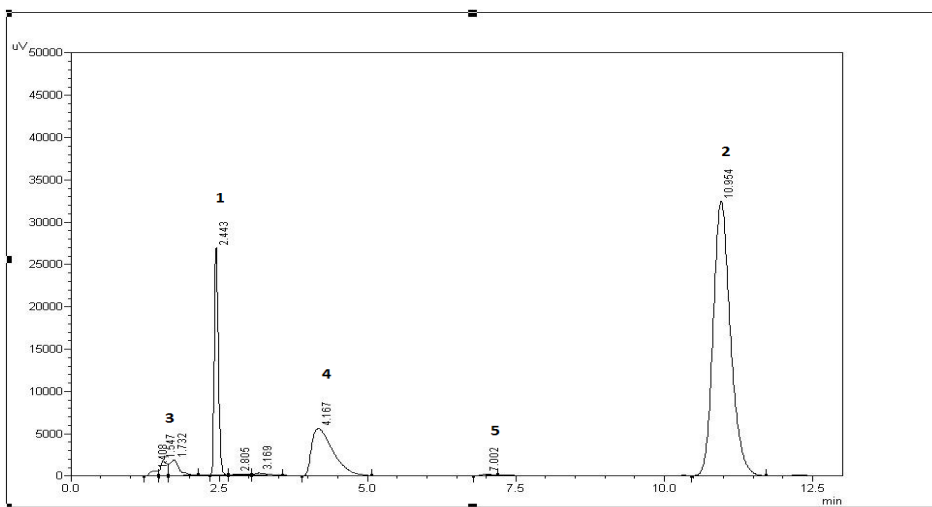
Krople recepturowe wersji 2R, średnia dla serii 1 i serii 2							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni piklu cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)	Dzień	Średnie pole powierzchni piklu cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)
0	1279803±1482	1,072±0,000	100,00	0	1285134±5385	1,076±0,585	100,00
3	1264516±3161	1,059±0,482	98,81±0,48	3	1251525±3664	1,048±0,188	97,39±0,53
6	1248178±6845	1,045±1,037	97,53±1,21	6	1111823±813	0,931±0,307	86,55±0,51
9	1240462±7767	1,039±0,189	96,93±0,18	9	589314±808	0,495±0,570	45,98±0,53
12	1229769±3646	1,030±0,857	96,10±0,82	12	1005825±4079	0,843±0,859	78,32±0,21
15	1210358±3279	1,014±0,459	94,59±0,43	15	939312±3984	0,787±0,214	73,15±0,27
18	1182737±2335	0,991±1,131	92,43±1,32	18	882478±71	0,740±0,622	68,74±0,03
21	1179701±3641	0,988±0,755	92,20±0,70	21	810290±1914	0,679±1,059	63,14±1,04
24	1177266±2500	0,986±0,747	92,01±0,69	24	761784±2779	0,639±0,477	59,37±0,06
27	1160048±1690	0,972±1,006	90,66±0,91	27	718062±1279	0,602±0,302	55,98±0,16
30	1138367±3105	0,953±0,383	88,97±0,34	30	647487±559	0,543±1,134	50,50±1,07



Rycina 32. Chromatogram świeżo sporządzonych 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 2R.
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego



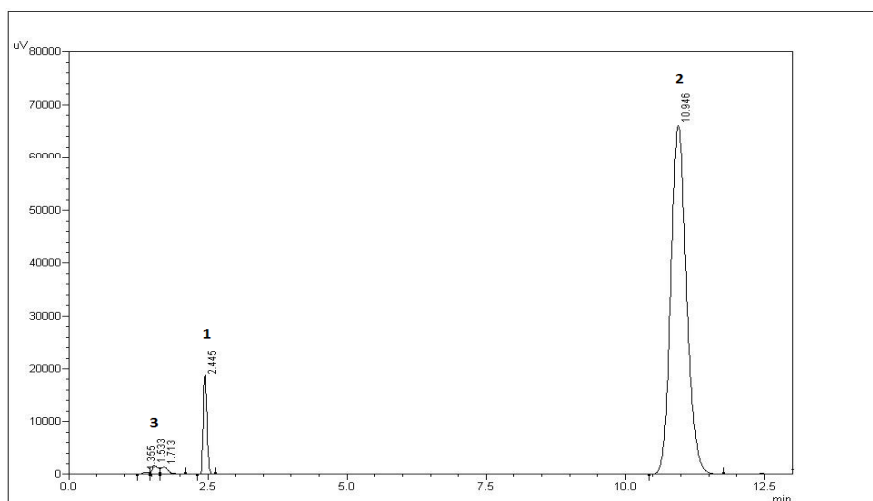
Rycina 33. Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 2R po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu



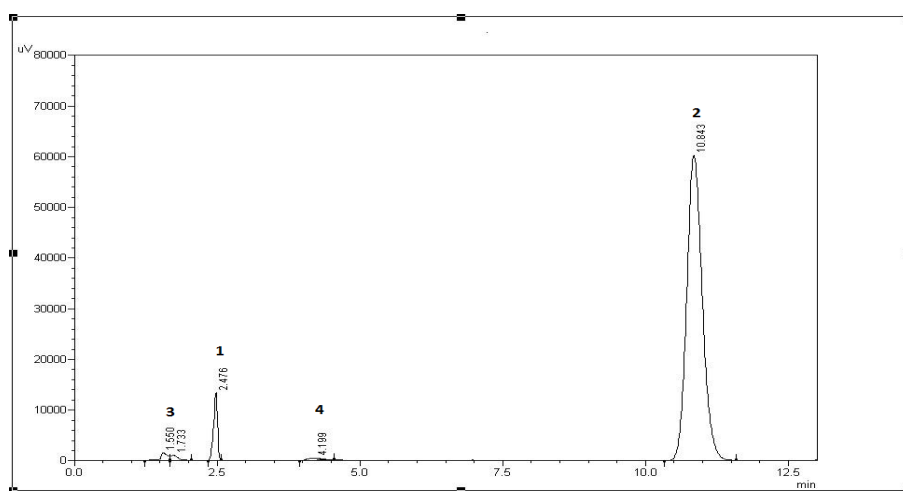
Rycina 34. Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 2R po 30 dniach przechowywania w temp. 20°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4-5- produkty rozkładu cefepimu

Tabela 41. Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 1% recepturowych kroplach do oczu wersji nr 3R świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną

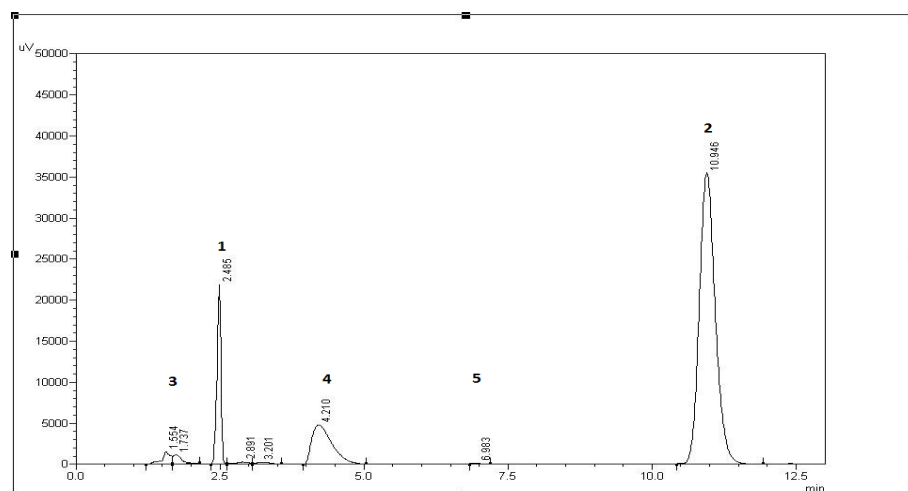
Krople recepturowe wersji 3R, średnia dla serii 1 i serii 2							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)	Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)
0	1294256±1075	1,084±0,357	100,00	0	1292367±5385	1,082±0,151	100,00
3	1270479±3109	1,064±1,097	98,17±0,73	3	1236370±3664	1,035±0,078	95,68±0,07
6	1261426±4668	1,056±0,717	97,47±0,35	6	1172214±813	0,982±1,244	90,72±0,99
9	1252758±2021	1,049±0,035	96,80±0,31	9	1075844±808	0,901±0,240	83,28±0,33
12	1243554±1412	1,041±0,913	96,09±1,22	12	1028065±4079	0,861±2,304	79,60±1,95
15	1208645±11037	1,012±0,231	93,40±0,55	15	937908±3984	0,786±2,228	72,64±1,51
18	1178998±2021	0,987±0,228	91,12±0,53	18	896405±70,	0,751±1,082	69,43±0,86
21	1169362±1637	0,979±0,447	90,37±0,73	21	838391±1914	0,703±0,465	64,95±0,20
24	1169149±1636	0,979±0,004	90,36±0,32	24	790191±2779	0,663±1,914	61,23±1,08
27	1152460±4689	0,965±0,058	89,07±0,27	27	696206±1279	0,584±0,600	53,98±0,24
30	1140055±2709	0,955±0,281	88,11±0,56	30	677495±559	0,568±0,866	52,53±0,38



Rycina 35. Chromatogram świeżo sporządzonych 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 3R.
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego



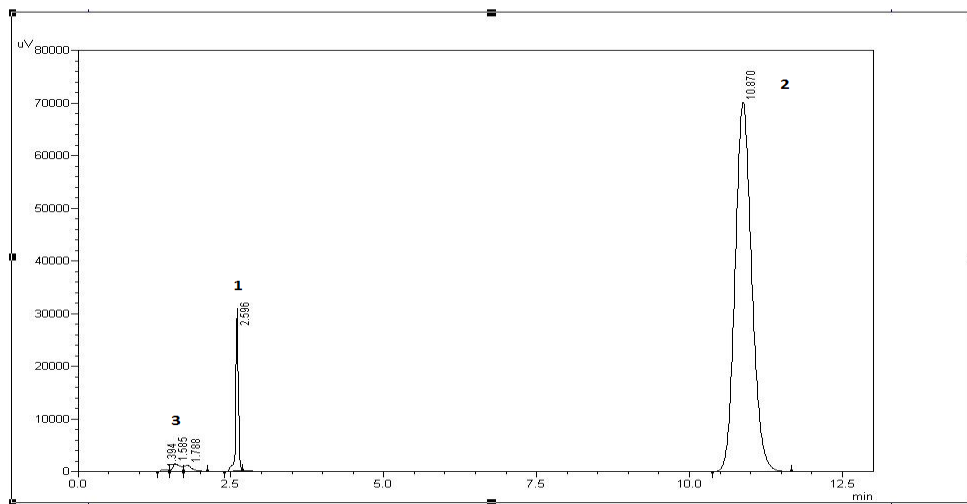
Rycina 36. Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 3R po 30 dniach przechowywania
w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu



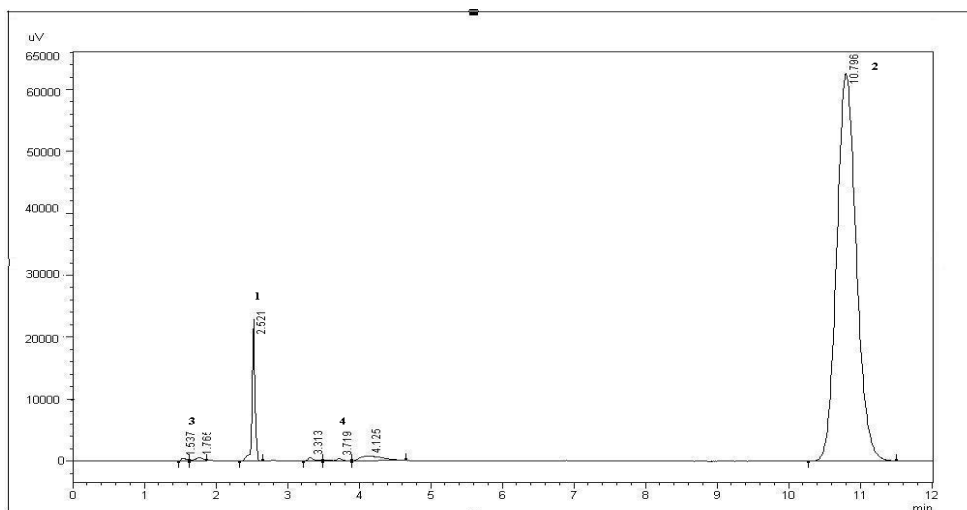
Rycina 37. Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 3R po 30 dniach przechowywania
w temp. 20°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4-5- produkty rozkładu cefepimu

Tabela 42. Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 1% recepturowych kroplach do oczu wersji nr 3aR świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną

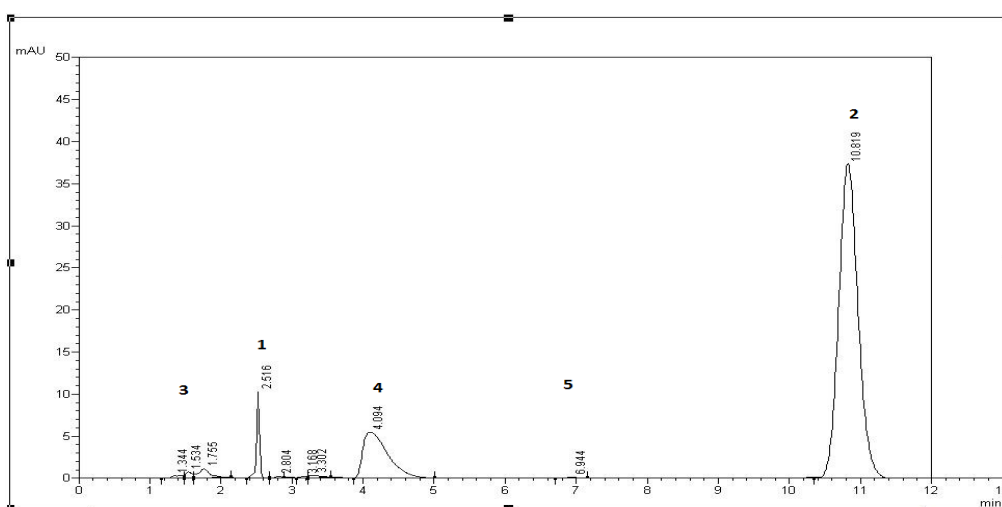
Krople recepturowe wersji 3aR, średnia dla serii 1 i serii 2							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni piklu cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)	Dzień	Średnie pole powierzchni piklu cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)
0	1322401±3671	1,076±0,329	100,00	0	1322401±3671	1,076±0,329	100,00
3	1298082±7845	1,057±1,038	98,17±1,34	3	1241675±942	1,011±0,754	93,91±0,40
6	1291893±31805	1,052±0,707	97,70±1,01	6	1173375±383	0,955±0,146	88,76±0,42
9	1280291±1251	1,042±0,250	96,82±0,56	9	1132112±1497	0,922±0,669	85,65±0,85
12	1269688±4110	1,034±0,486	96,02±0,78	12	1049622±448	0,855±0,294	79,42±0,49
15	1261612±6532	1,027±0,711	95,41±0,99	15	984097±499	0,802±0,121	74,48±0,34
18	1238651±5594	1,008±0,365	93,68±0,65	18	945323±374	0,770±1,000	71,56±1,10
21	1196631±2995	0,974±0,147	90,51±0,43	21	874024±434	0,712±0,042	66,18±0,19
24	1181003±1240	0,962±1,013	89,33±0,61	24	756509±336	0,617±0,801	57,31±0,27
27	1172955±624	0,955±0,353	88,73±0,02	27	755225±313	0,616±0,472	57,22±0,08
30	1166627±5801	0,950±0,472	88,25±0,13	30	710039±351	0,579±0,221	53,81±0,30



Rycina 38. Chromatogram świeżo sporządzonych 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 3aR.
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego



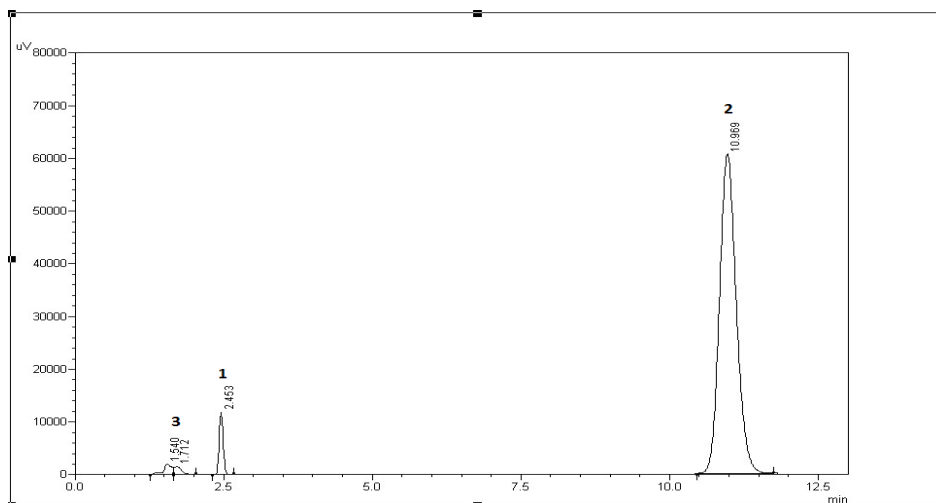
Rycina 39. Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 3aR po 30 dniach przechowywania
w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkty rozkładu cefepimu



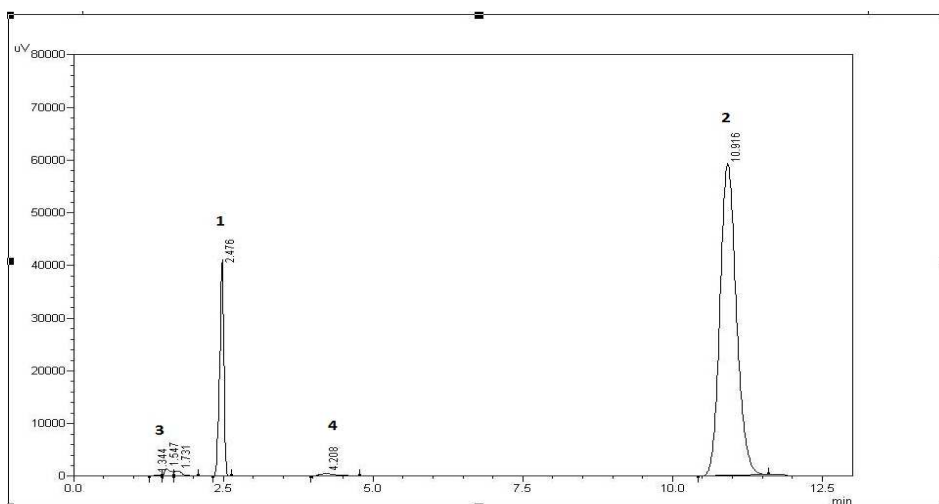
Rycina 40. Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 3aR po 30 dniach przechowywania
w temp. 20°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkty rozkładu cefepimu

Tabela 43. Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 1% recepturowych kroplach do oczu wersji nr 4R świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną

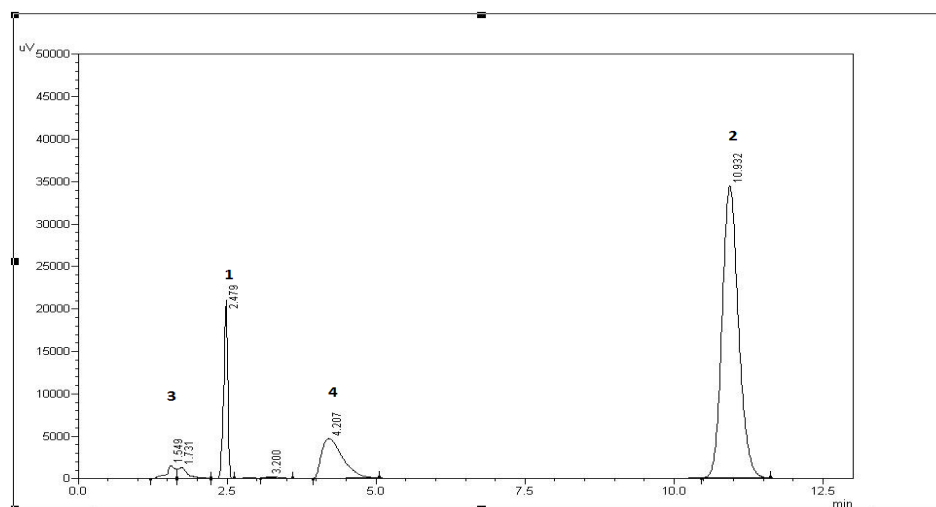
Krople recepturowe wersji 4R, średnia dla serii 1 i serii 2							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)	Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)
0	1237833±1982	1,037±0,959	100,00	0	1189647±1075	0,996±0,175	100,00
3	1232659±4711	1,032±0,265	99,58±0,30	3	1186880±8448	0,994±0,246	99,77±0,17
6	1210367±6967	1,014±0,243	97,79±0,28	6	1155240±2186	0,968±0,184	97,12±0,11
9	1199524±5832	1,005±1,006	96,91±0,63	9	1061343±6788	0,889±0,437	89,24±0,55
12	1184703±3322	0,992±0,413	95,72±1,08	12	993005±2273	0,832±1,101	83,51±1,02
15	1180410±1551	0,989±0,073	95,37±1,04	15	925636±4002	0,776±0,242	77,86±0,05
18	1178998±2021	0,987±0,228	95,26±0,65	18	860802±2897	0,722±0,002	72,43±0,13
21	1166990±878	0,977±0,734	94,29±1,15	21	819364±977	0,687±0,891	68,95±0,74
24	1153990±2258	0,967±1,849	93,24±0,10	24	762735±4146	0,640±0,237	64,20±1,02
27	1138941±2087	0,954±0,419	92,03±1,02	27	692594±1359	0,581±0,757	58,32±0,29
30	1102711±3317	0,924±0,502	89,11±0,30	30	663251±918	0,557±0,457	55,86±0,35



Rycina 41. Chromatogram świeżo sporządzonych 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 4R.
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego



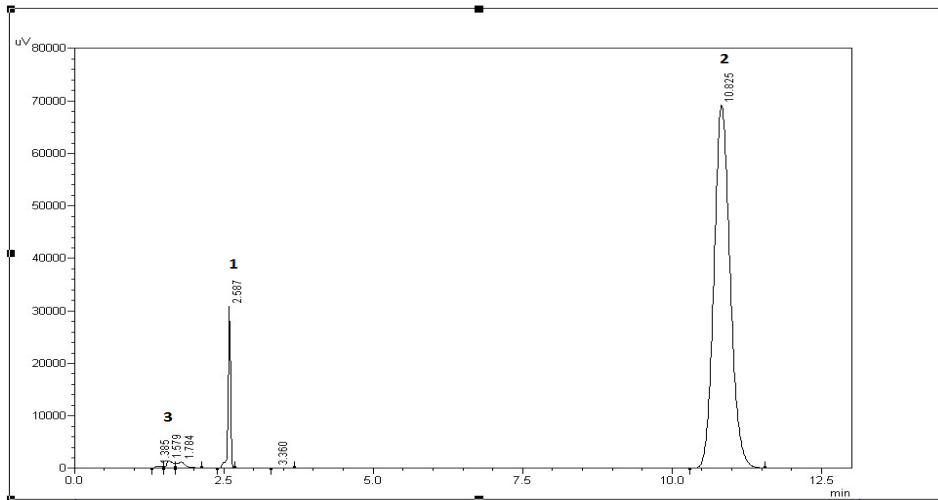
Rycina 42. Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 4R po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu



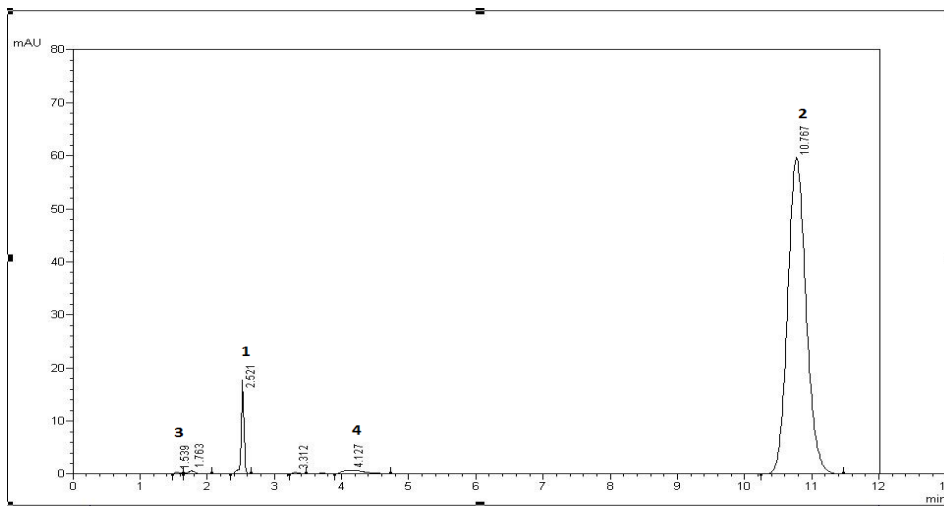
Rycina 43. Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 4R po 30 dniach przechowywania w temp. 20°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu

Tabela 44. Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 1% recepturowych kroplach do oczu wersji nr 4aR świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną

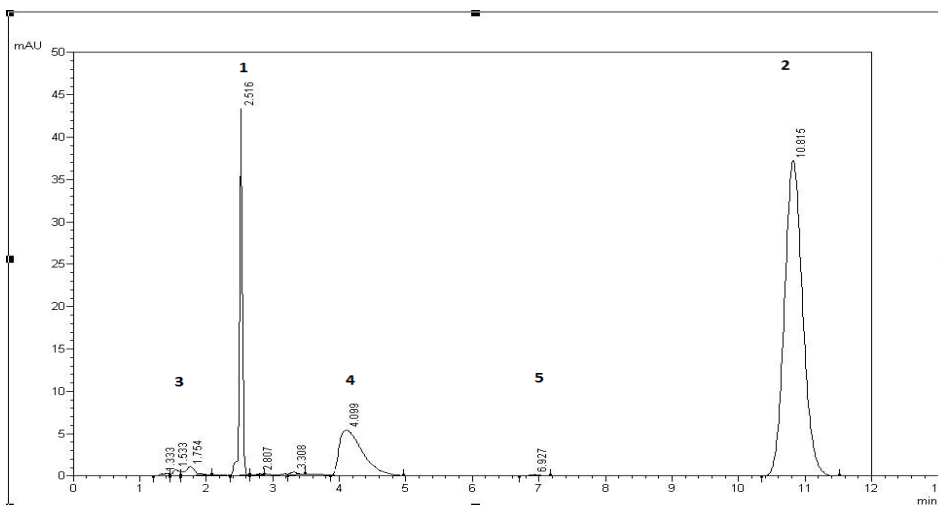
Krople recepturowe wersji 4aR, średnia dla serii 1 i serii 2							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)	Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)
0	1299562±5068	1,058±0,212	100,00	0	1265157±4929	1,030±0,366	100,00
3	1290884±57128	1,051±0,517	99,33±0,68	3	1226986±1630	0,999±0,043	96,99±0,32
6	1281297±4783	1,043±0,336	98,60±0,13	6	1168444±1046	0,951±0,077	92,38±0,44
9	1276234±4059	1,039±0,101	98,21±0,84	9	1124612±887	0,916±0,100	88,92±0,46
12	1267233±1499	1,032±0,432	97,52±0,13	12	1046958±3527	0,853±0,433	82,80±0,78
15	1252701±287	1,020±1,027	96,40±0,48	15	982528±4757	0,800±0,271	77,72±0,09
18	1241141±48357	1,010±1,057	95,52±0,97	18	937386±692	0,764±0,821	74,16±0,43
21	1193163±1076	0,971±0,659	91,83±0,46	21	875003±409	0,713±0,344	69,24±0,02
24	1150657±22226	0,937±0,413	88,57±0,28	24	758329±401	0,618±0,860	60,04±0,44
27	1137105±6500	0,926±0,425	87,53±0,27	27	755037±334	0,616±0,796	59,78±1,02
30	1123579±8660	0,915±0,310	86,49±0,54	30	708791±497	0,578±0,233	56,14±0,12



Rycina 44. Chromatogram świeżo sporządzonych 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 4aR.
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego



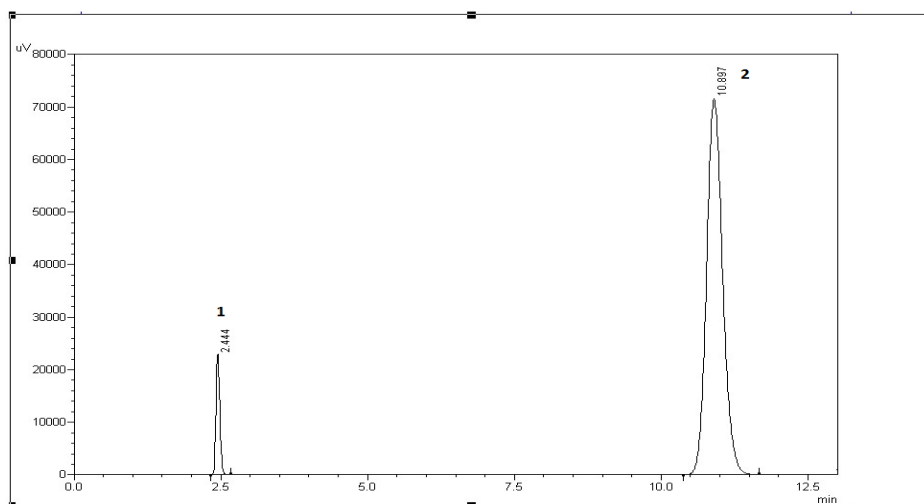
Rycina 45. Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 4aR po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu



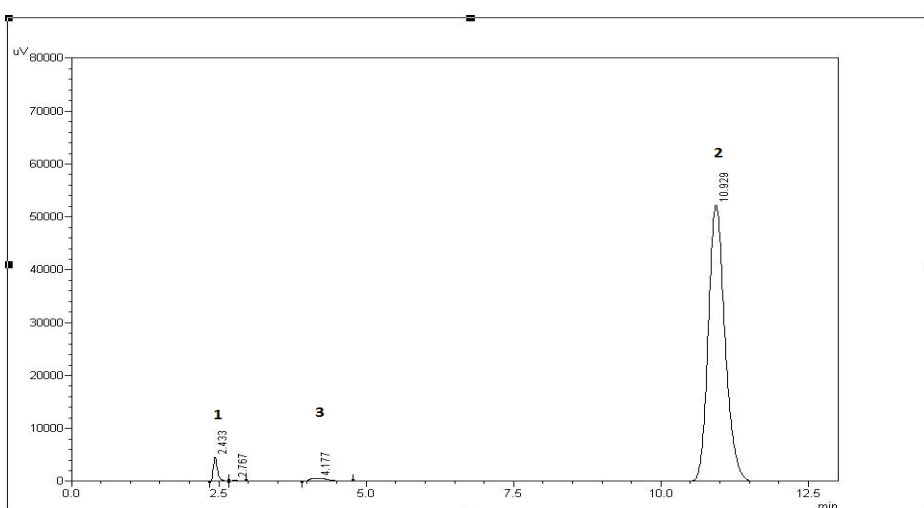
Rycina 46. Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 4aR po 30 dniach przechowywania w temp. 20°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- 5- produkty rozkładu cefepimu

Tabela 45. Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 5% roztworach wodnych (0_{5%}) świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną

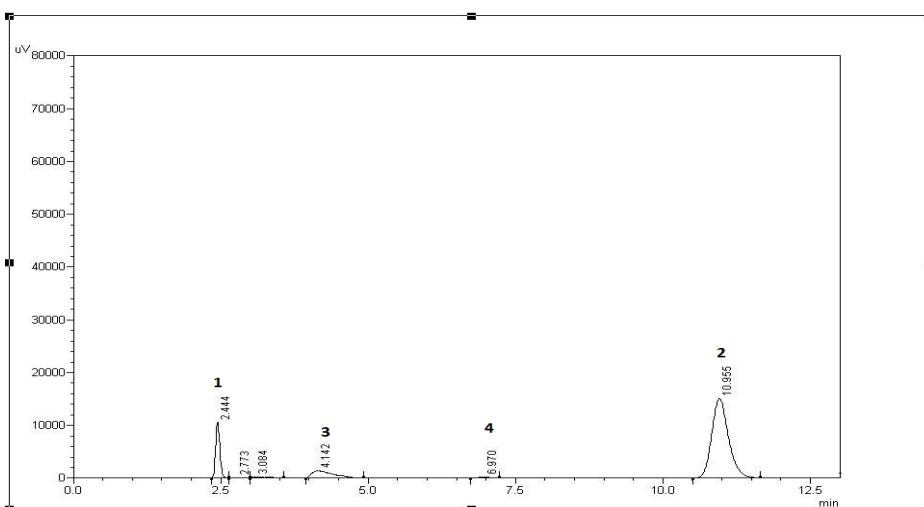
5% roztwory wodne dichlorowodorku cefepimu (0 _{5%}), średnia dla serii 1 i serii 2							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)	Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)
0	1237406±4787	5,181±0,013	100,00	0	1238018±5431	5,183±0,021	100,00
3	1226108±2274	5,134±0,007	99,09±0,02	3	1153734±3534	4,831±0,184	93,21±0,16
6	1207066±4376	5,054±0,145	97,55±0,16	6	1050866±4307	4,402±0,152	84,92±0,13
9	1183782±4354	4,957±0,518	95,68±0,53	9	944368±8207	3,957±0,183	76,34±0,16
12	1177485±6373	4,931±0,370	95,17±0,38	12	848986±6990	3,559±0,390	68,65±0,41
15	1159449±3431	4,855±0,213	93,72±0,20	15	745435±3287	3,126±0,394	60,31±0,42
18	1118282±2769	4,683±0,015	90,40±0,03	18	573186±4439	2,407±1,107	46,43±1,08
21	1110322±4662	4,650±0,050	89,75±0,04	21	503234±2276	2,114±1,086	40,79±1,06
24	1103693±1947	4,622±0,129	89,22±0,11	24	427364±4070	1,797±0,223	34,68±0,20
27	1098793±7031	4,602±0,182	88,83±0,19	27	329407±1240	1,388±0,498	26,78±0,48
30	1080686±4194	4,526±0,334	87,37±0,32	30	268657±699	1,135±0,592	21,89±0,61



Rycina 47. Chromatogram świeżo sporządzonego 5% wodnego roztworu cefepimu (0.5%)
1- uracyl, 2- cefepim



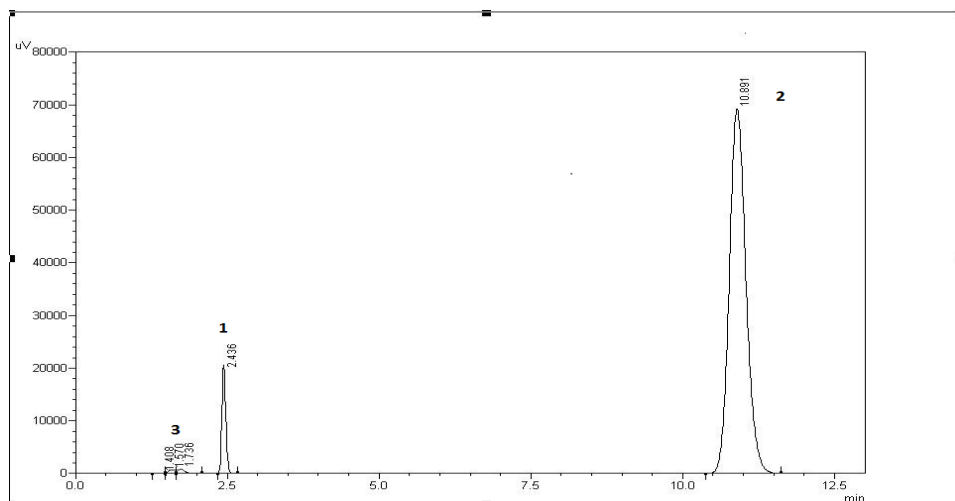
Rycina 48. Chromatogram 5% wodnego roztworu cefepimu (0.5%) po 30 dniach przechowywania
w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- produkt rozkładu cefepimu



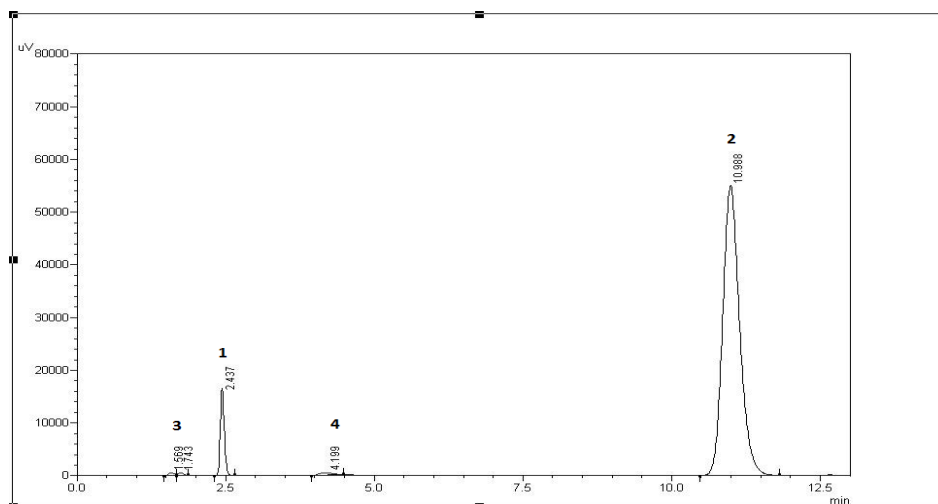
Rycina 49. Chromatogram 5% wodnego roztworu cefepimu (0.5%) po 30 dniach przechowywania
w temp. 20°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- 4- produkty rozkładu cefepimu

Tabela 46. Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 5% recepturowych kroplach do oczu wersji nr IR świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną

Krople recepturowe wersji IR, średnia dla serii 1 i serii 2							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)	Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)
0	1210342±5891	5,068±0,129	100,00	0	1210342±5891	5,068±0,129	100,00
3	1192311±7750	4,993±0,203	98,51±0,33	3	1086340±4071	4,550±0,112	89,78±0,24
6	1186710±2897	4,969±0,353	98,05±0,48	6	962402±2412	4,032±0,435	79,57±0,56
9	1152363±7042	4,826±0,112	95,22±0,24	9	860665±4751	3,607±1,109	71,18±1,01
12	1141644±2273	4,781±0,101	94,34±0,03	12	764502±4103	3,206±0,075	63,25±0,05
15	1118296±5744	4,683±0,398	92,41±0,27	15	683599±2288	2,868±0,328	56,59±0,19
18	1099056±3441	4,603±0,194	90,83±0,06	18	668655±2223	2,805±0,278	55,36±0,14
21	1084255±5301	4,541±0,144	89,61±0,27	21	584828±3434	2,455±1,057	48,45±0,53
24	1072713±1721	4,493±0,649	88,66±0,78	24	503477±4125	2,115±0,070	41,74±0,94
27	1052308±5583	4,408±0,186	86,98±0,32	27	486782±2476	2,046±1,592	40,37±0,46
30	1038342±4406	4,349±0,255	85,82±0,38	30	353638±2358	1,490±3,467	29,39±0,34

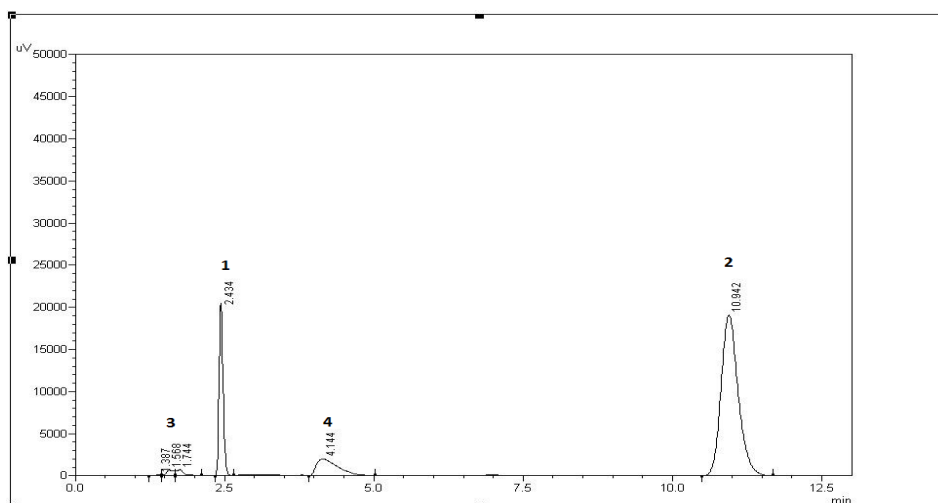


Rycina 50. Chromatogram świeżo sporządzonych 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IR.
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego



Rycina 51. Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IR po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C

1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu

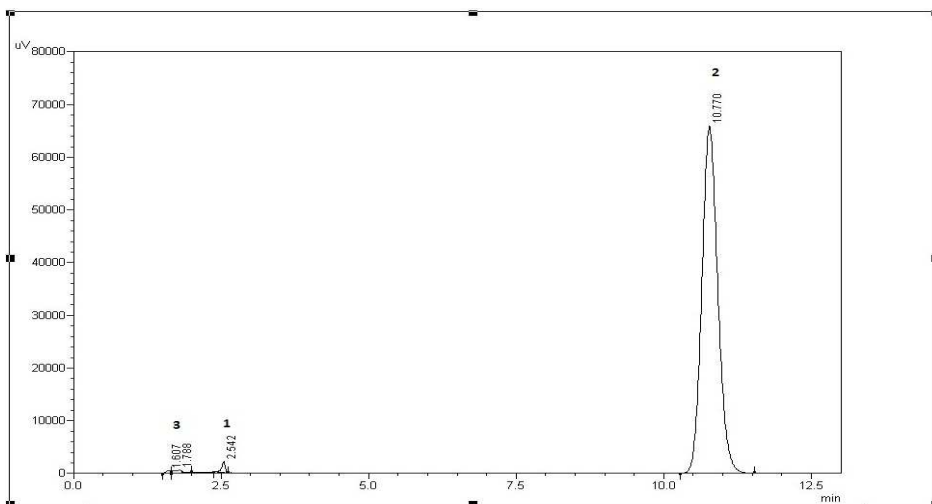


Rycina 52. Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IR po 30 dniach przechowywania w temp. 20°C

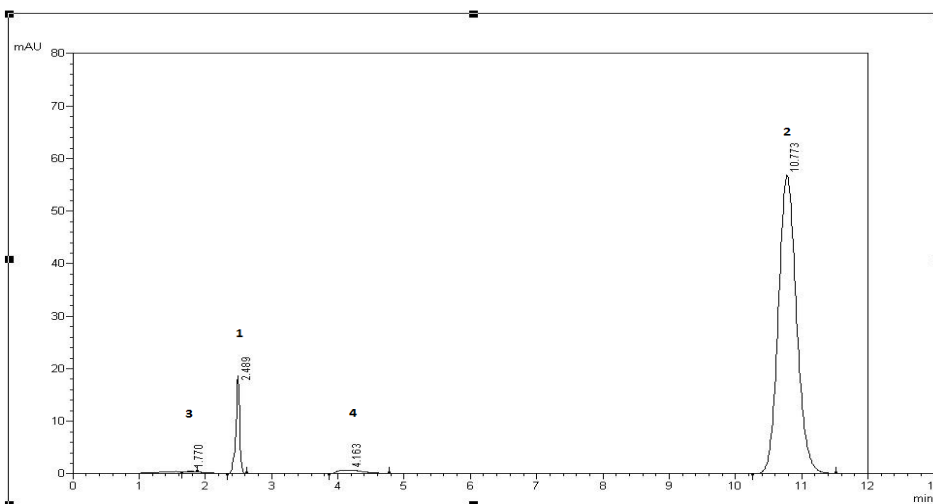
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu

Tabela 47. Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 5% recepturowych kroplach do oczu wersji nr IaR świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną

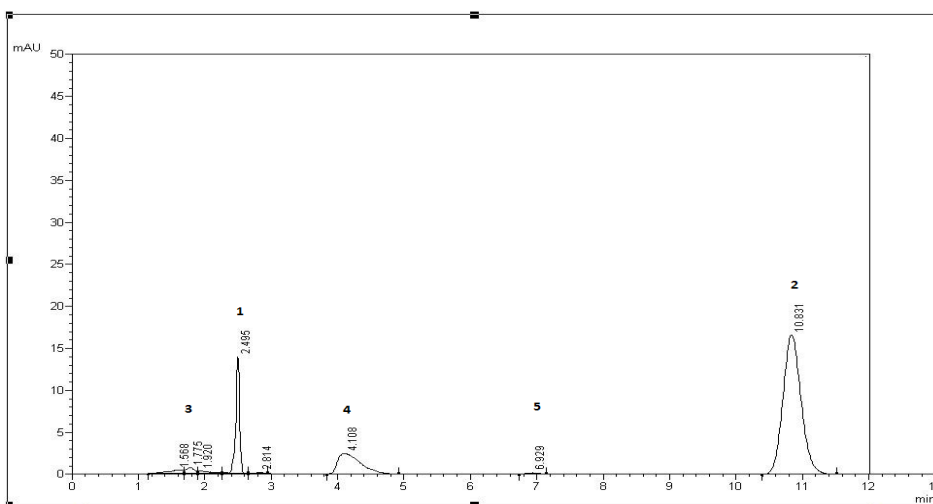
Krople recepturowe wersji IaR, średnia dla serii 1 i serii 2							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)	Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)
0	1236475±3851	5,033±0,140	100,00	0	1236475±3851	5,033±0,140	100,00
3	1214884±5092	4,945±0,201	98,26±0,34	3	1122883±843	4,572±0,106	90,84±0,03
6	1199843±4341	4,884±0,328	97,05±0,47	6	1026798±746	4,182±0,246	83,09±0,10
9	1196714±5984	4,871±0,415	96,79±0,56	9	935623±856	3,811±0,004	75,73±0,14
12	1173887±3053	4,779±0,229	94,95±0,37	12	846409±410	3,449±0,141	68,54±0,28
15	1148713±7684	4,676±0,393	92,92±0,53	15	756983±1267	3,086±0,341	61,32±0,20
18	1112950±1734	4,531±0,126	90,04±0,01	18	653112±2599	2,665±0,827	52,94±0,97
21	1104577±3891	4,497±0,208	89,36±0,07	21	549573±542	2,244±0,904	44,59±0,05
24	1091513±1312	4,444±0,016	88,31±0,16	24	289699±1083	1,189±0,896	23,63±0,04
27	1085217±845	4,419±0,281	87,80±0,42	27	276409±605	1,135±0,162	22,56±1,00
30	1045946±6748	4,259±1,921	84,63±2,06	30	211924±332	0,874±0,787	17,36±0,93



Rycina 53. Chromatogram świeżo sporządzonych 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IaR
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego



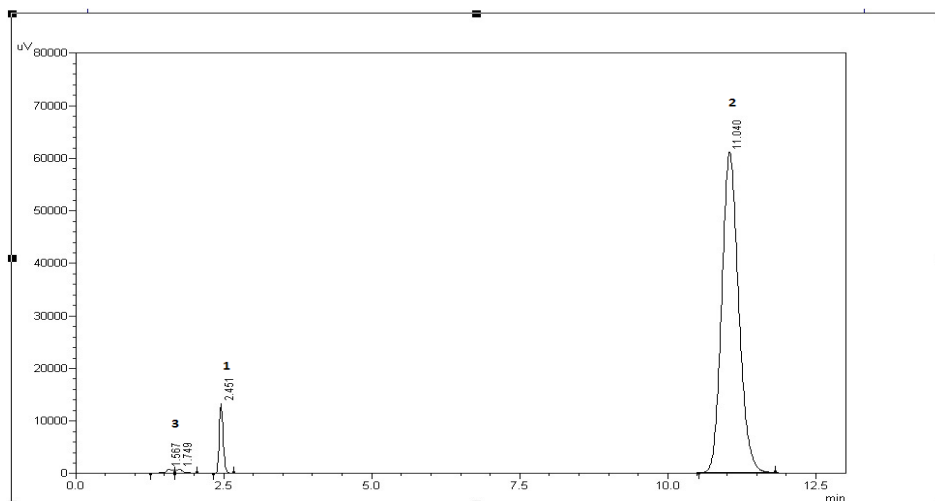
Rycina 54. Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IaR po 30 dniach przechowywania
w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu



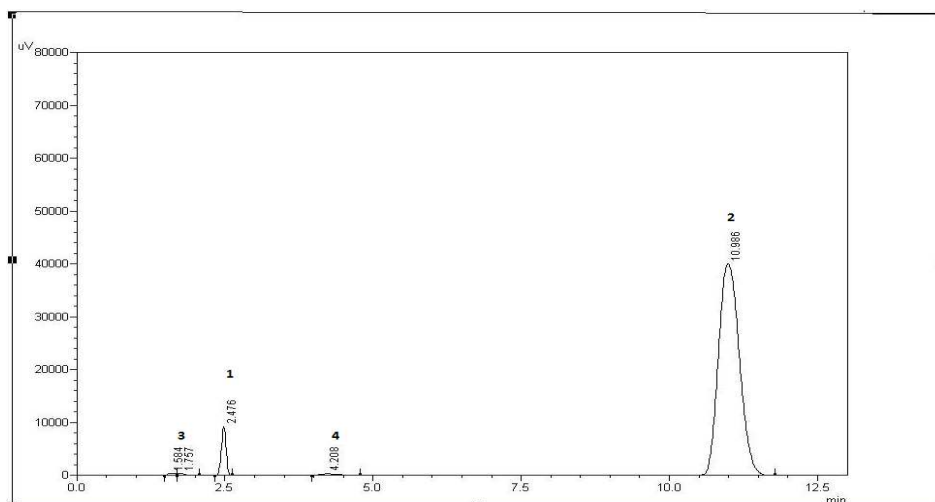
Rycina 55. Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IaR po 30 dniach przechowywania
w temp. 20°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4-5- produkty rozkładu cefepimu

Tabela 48. Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 5% recepturowych kroplach do oczu wersji nr IIR świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną

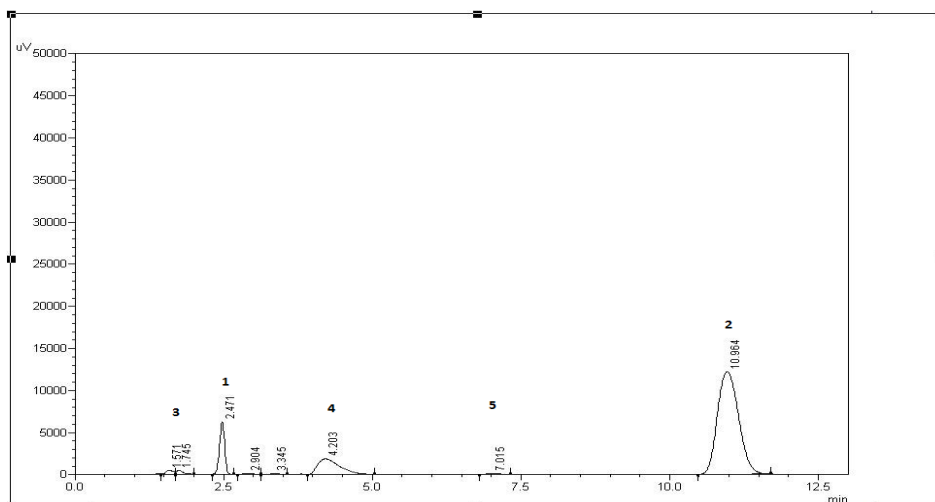
Krople recepturowe wersji IIR, średnia dla serii 1 i serii 2							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)	Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)
0	1208115±3581	5,059±0,032	100,00	0	1208115±3581	5,059±0,032	100,00
3	1183637±2762	4,956±1,060	97,98±1,03	3	1029718±45261	4,313±0,341	85,27±0,37
6	1174940±5079	4,920±0,312	97,26±1,08	6	943452±49761	3,953±0,820	78,15±0,79
9	1141723±1768	4,781±0,184	94,52±0,15	9	856096±5998	3,588±0,089	70,93±0,12
12	1103192±4952	4,620±0,914	91,34±0,88	12	716328±5873	3,004±0,388	59,39±0,36
15	1077351±4393	4,512±0,660	89,20±0,63	15	637067±2303	2,673±0,321	52,85±0,29
18	1067950±1331	4,473±1,040	88,43±1,08	18	580027±1158	2,435±0,731	48,14±0,70
21	1038395±1765	4,350±1,028	85,99±1,09	21	459281±1417	1,931±0,774	38,17±0,74
24	1016432±2857	4,258±0,849	84,17±0,82	24	399092±1972	1,679±0,319	33,20±0,35
27	1014370±4508	4,249±0,907	84,00±0,87	27	353483±2911	1,489±0,697	29,43±0,73
30	997763±2346	4,180±0,400	82,63±0,37	30	289210±1323	1,220±3,243	24,13±3,21



Rycina 56. Chromatogram świeżo sporządzonych 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IIIR
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego



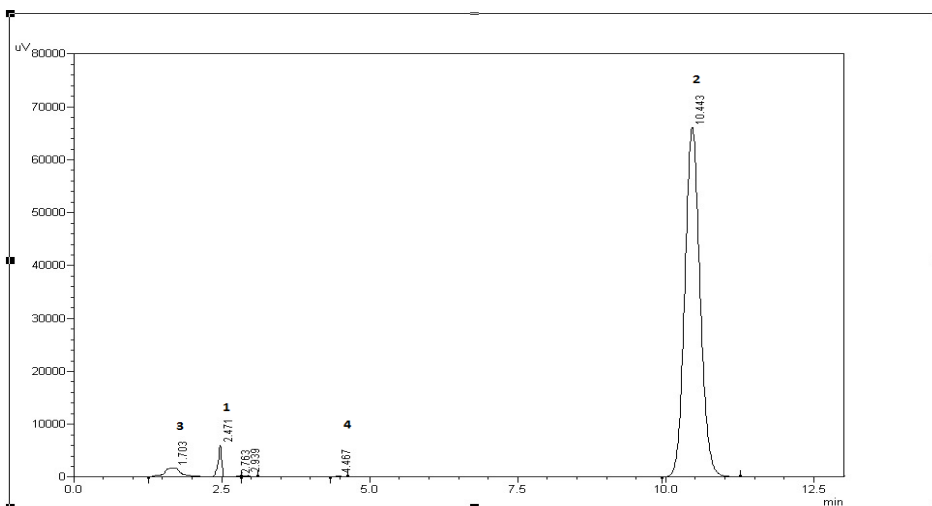
Rycina 57. Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IIIR po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu



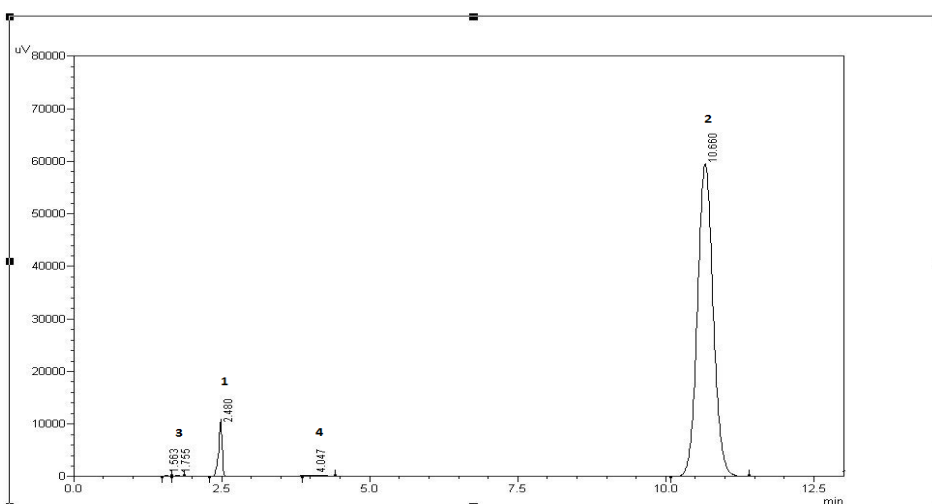
Rycina 58. Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IIIR po 30 dniach przechowywania w temp. 20°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4-5- produkty rozkładu cefepimu

Tabela 49. Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 5% recepturowych kroplach do oczu wersji nr IIIaR świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną

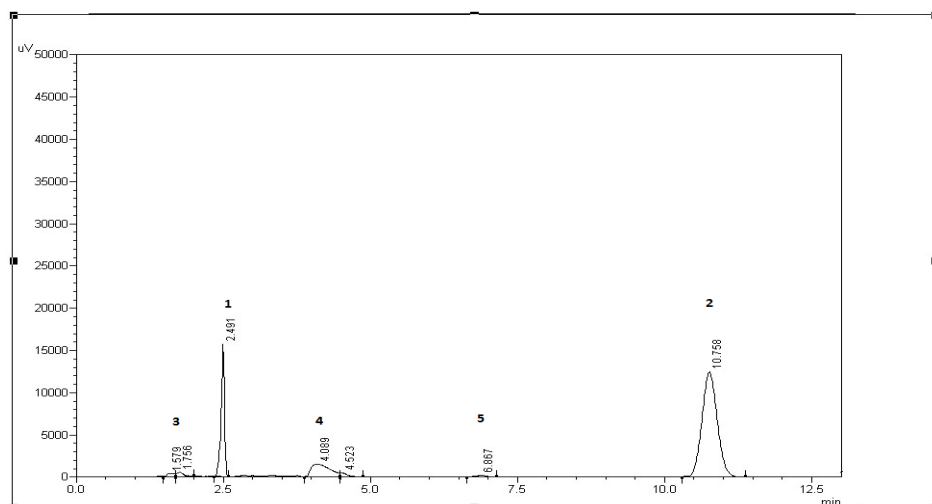
Krople recepturowe wersji IIIaR, średnia dla serii 1 i serii 2							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)	Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)
0	1299648±1765	5,289±0,138	100,00	0	1299648±4220	5,289±0,138	100,00
3	1291800±4246	5,257±0,017	99,40±0,15	3	1241675±5773	5,054±0,188	95,55±0,32
6	1285280±5137	5,231±0,005	98,90±0,13	6	1170040±7892	4,763±0,329	90,05±0,47
9	1280653±1046	5,212±0,087	98,54±0,05	9	1128273±3384	4,593±0,159	86,85±0,02
12	1268522±1692	5,163±0,123	97,61±0,01	12	1044588±8097	4,254±0,038	80,42±0,10
15	1253391±4004	5,101±0,102	96,45±0,04	15	988280±6683	4,025±0,117	76,10±0,25
18	1240730±4186	5,050±0,036	95,48±0,17	18	957326±3462	3,900±0,153	73,73±0,29
21	1170848±5823	4,766±0,065	90,11±0,07	21	875203±1025	3,566±0,009	67,42±0,15
24	1164021±4337	4,739±0,228	89,59±0,09	24	755081±834	3,079±0,247	58,20±0,38
27	1157588±3328	4,712±0,112	89,10±0,02	27	748239±3164	3,051±0,384	57,68±0,24
30	1128387±5519	4,594±0,321	86,86±0,18	30	708801±4453	2,891±0,064	54,65±0,20



Rycina 59. Chromatogram świeżo sporządzonych 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IIIaR
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu



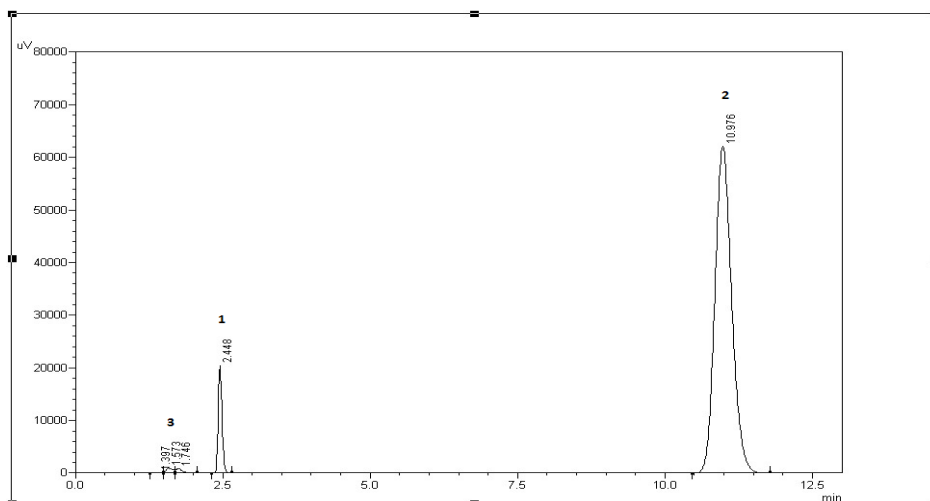
Rycina 60. Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IIIaR po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu



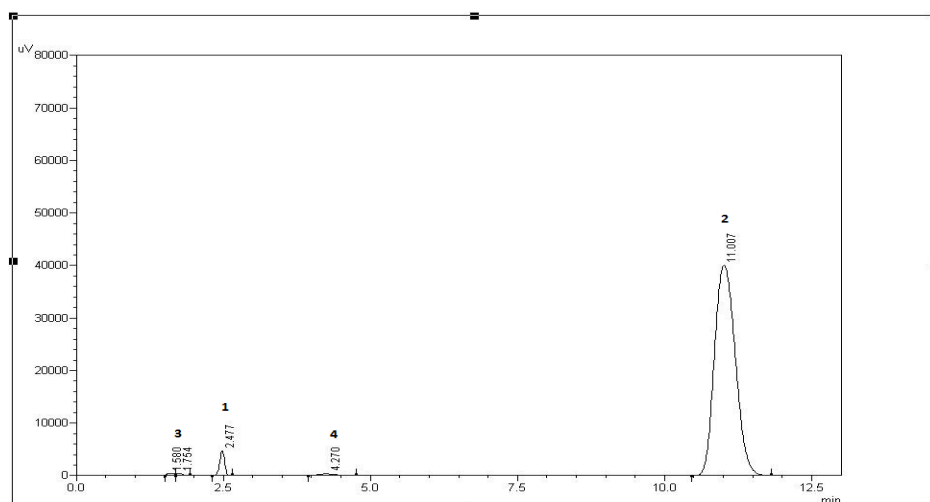
Rycina 61. Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IIIaR po 30 dniach przechowywania w temp. 20°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4-5- produkty rozkładu cefepimu

Tabela 50. Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 5% recepturowych kroplach do oczu wersji nr IVR świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną

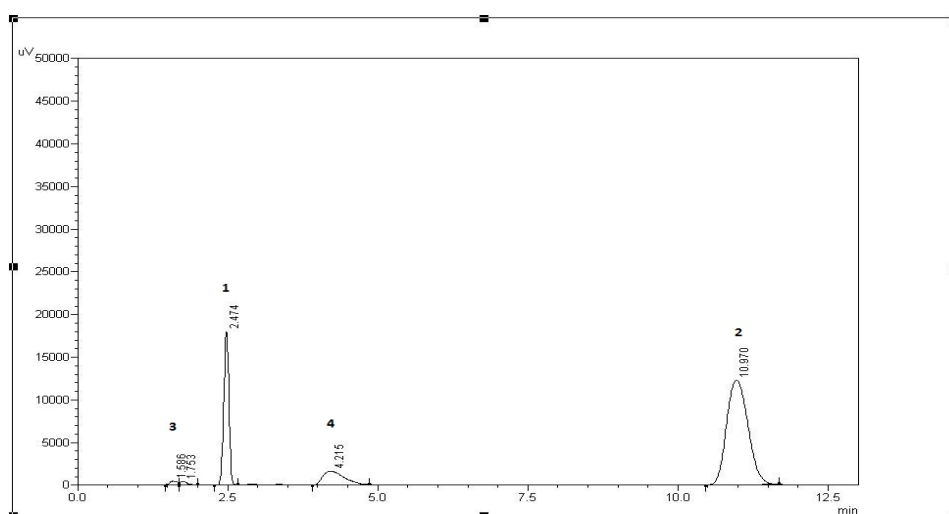
Krople recepturowe wersji IVR, średnia dla serii 1 i serii 2							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)	Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)
0	1216826±1886	5,095±0,469	100,00	0	1216826±1886	5,095±0,469	100,00
3	1157858±65141	4,849±0,051	95,17±0,42	3	1028569±1414	4,309±0,636	84,57±0,17
6	1151988±4196	4,824±0,044	94,68±0,43	6	953606±3941	3,996±1,047	78,42±0,58
9	1139621±6625	4,772±0,437	93,67±0,03	9	857299±2233	3,593±0,269	70,53±0,74
12	1101669±2503	4,614±0,435	90,56±0,035	12	724023±4075	3,037±0,476	59,60±0,08
15	1077335±3671	4,512±0,094	88,56±0,567	15	653937±1388	2,744±0,157	53,85±0,63
18	1040256±1702	4,357±0,829	85,52±1,307	18	579764±1041	2,434±0,163	47,77±0,31
21	1022887±1649	4,285±0,408	84,10±0,883	21	484759±3862	2,037±0,209	39,99±0,26
24	1007457±1350	4,220±0,477	82,84±0,007	24	420964±2979	1,771±0,031	34,76±0,50
27	989974±3486	4,147±0,142	81,40±0,615	27	372452±3219	1,568±0,018	30,78±0,45
30	985294±4783	4,128±0,040	81,02±0,432	30	309022±1661	1,303±1,000	25,58±0,53



Rycina 62. Chromatogram świeżo sporządzonych 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IVR.
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego



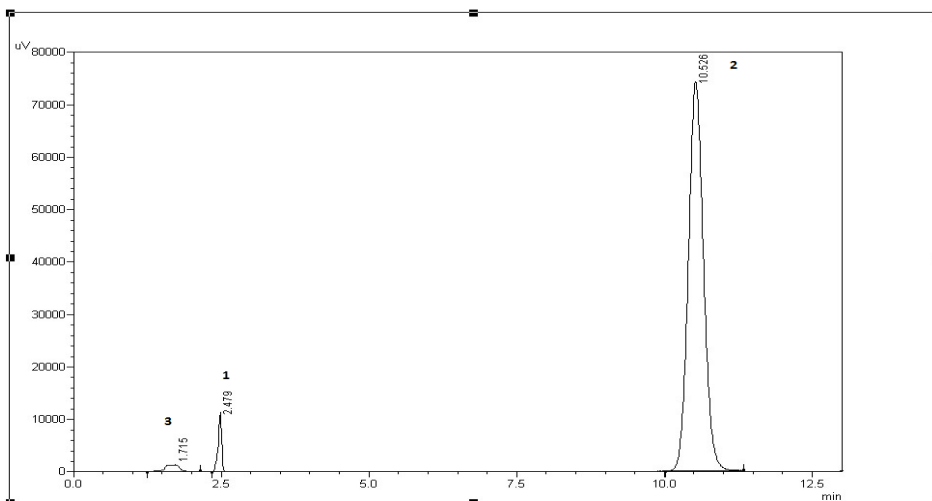
Rycina 63. Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IVR po 30 dniach przechowywania
w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu



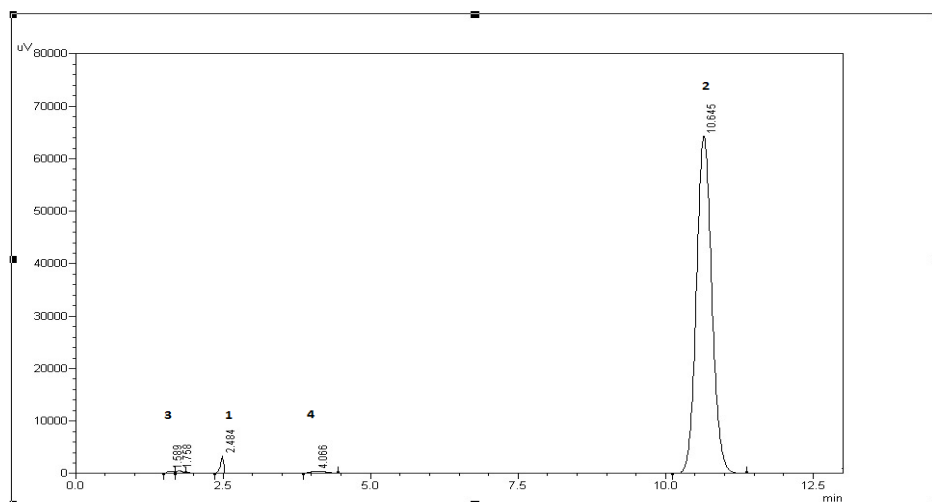
Rycina 64. Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IVR po 30 dniach przechowywania
w temp. 20°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu

Tabela 51. Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 5% recepturowych kroplach do oczu wersji nr IVaR świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną

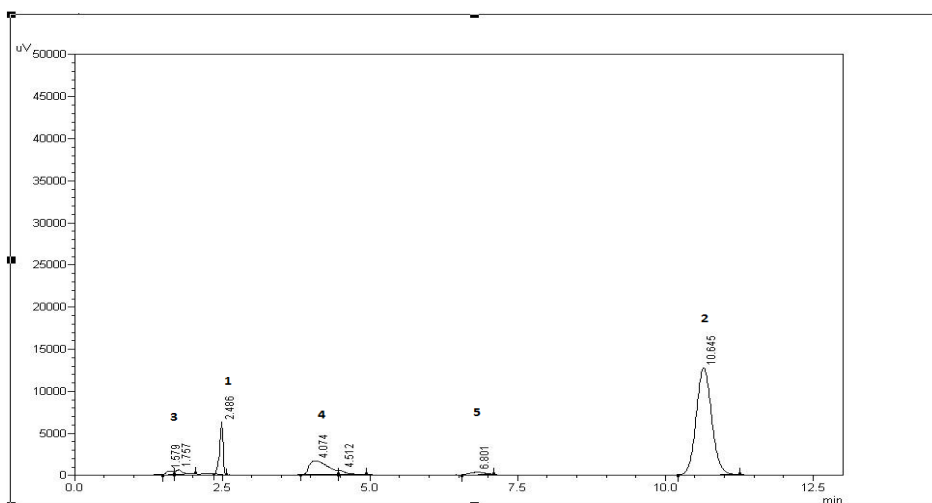
Krople recepturowe wersji IVaR, średnia dla serii 1 i serii 2							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)	Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)
0	1298356±5575	5,284±0,306	100,00	0	1295062±7794	5,271±0,066	100,00
3	1287057±3307	5,238±0,335	99,13±0,03	3	1231268±4128	5,012±0,265	95,09±0,15
6	1274630±1836	5,188±0,312	98,18±0,01	6	1143265±10279	4,654±0,233	88,31±0,20
9	1264798±7262	5,148±0,334	97,42±0,03	9	1122659±3508	4,571±0,036	86,72±0,17
12	1256188±5889	5,113±0,201	96,76±0,10	12	1043670±4060	4,250±0,013	80,64±0,03
15	1248135±7372	5,080±0,255	96,14±0,05	15	979517±4946,	3,990±0,466	75,70±0,08
18	1242236±3862	5,056±0,227	95,69±0,08	18	927537±4815	3,779±0,219	71,69±0,40
21	1189164±4733	4,841±0,529	91,61±0,22	21	886066±69450	3,610±0,025	68,50±0,15
24	1156261±1572	4,707±0,004	89,08±0,30	24	751666±4391	3,065±0,222	58,15±0,09
27	1149927±1983	4,681±0,351	88,60±0,04	27	732369±44780	2,986±0,474	56,66±0,16
30	1129327±3029	4,598±0,284	87,01±0,02	30	711464±4411	2,901±0,392	55,05±0,41



Rycina 65. Chromatogram świeżo sporządzonych 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IVaR
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego



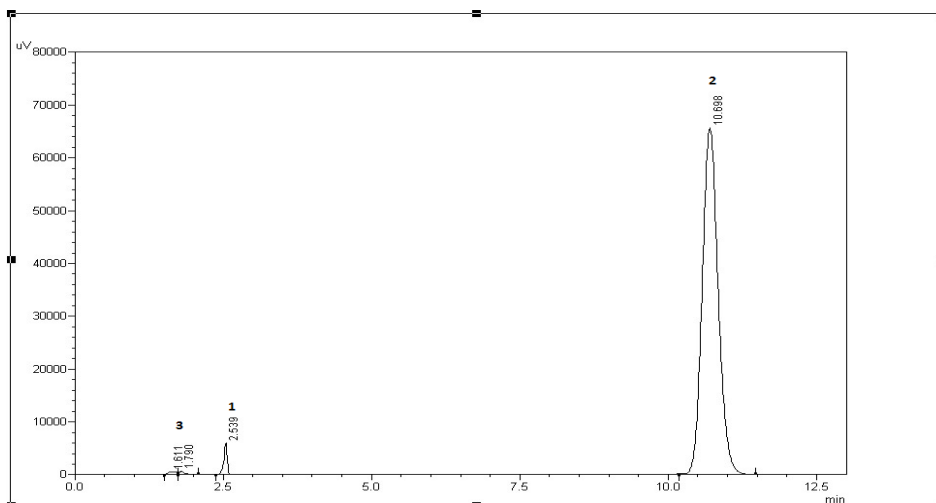
Rycina 66. Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IVaR po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu



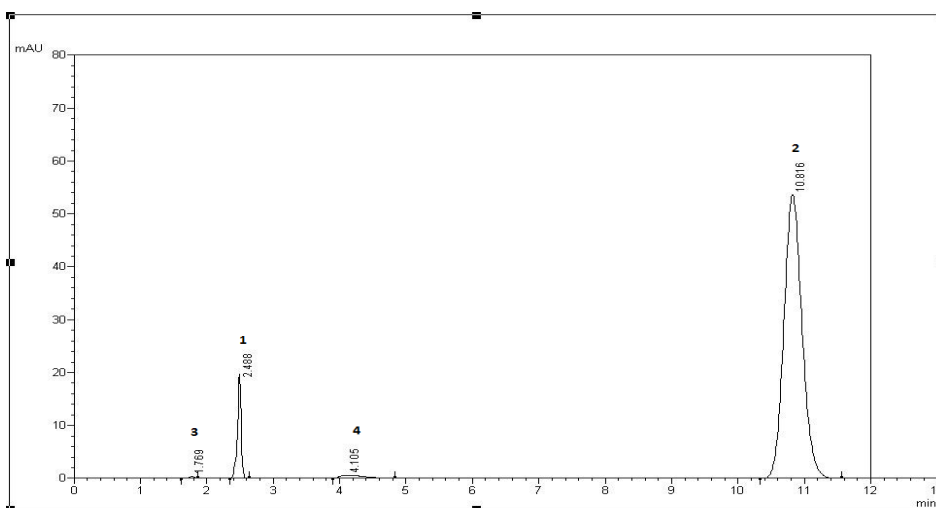
Rycina 67. Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IVaR po 30 dniach przechowywania w temp. 20°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4-5- produkty rozkładu cefepimu

Tabela 52. Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 5% recepturowych kroplach do oczu wersji nr IVbR świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną

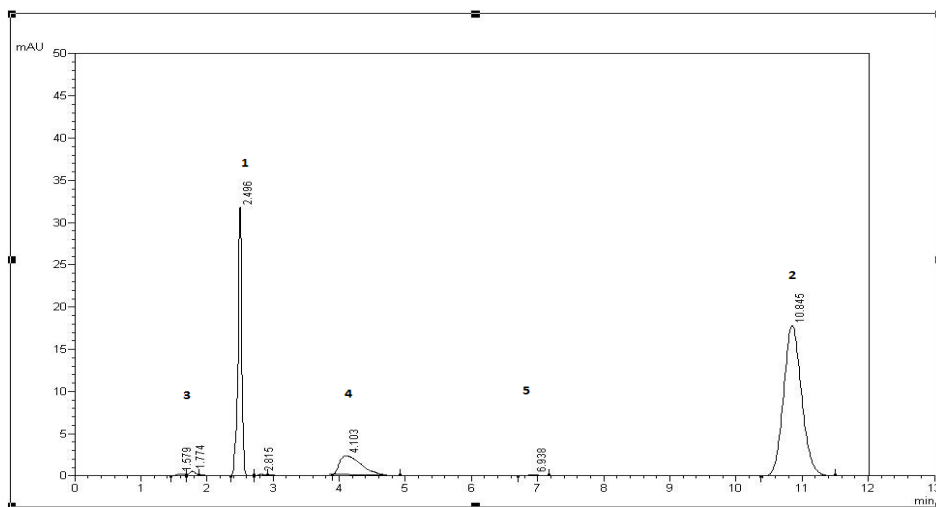
Krople recepturowe wersji IVbR, średnia dla serii 1 i serii 2							
Temperatura przechowywania 4°C				Temperatura przechowywania 20°C			
Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)	Dzień	Średnie pole powierzchni pików cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)
0	1252188±12342	5,097±0,187	100,00	0	1252188±12342	5,097±0,187	100,00
3	1182466±5036	4,813±0,129	94,45±0,06	3	1099166±862	4,475±0,004	87,81±0,19
6	1165628±1846	4,745±0,045	93,11±0,23	6	997146±975	4,061±0,376	79,69±0,19
9	1152408±1931	4,691±0,490	92,05±0,68	9	938926±1182	3,825±0,115	75,05±0,30
12	1136865±8399	4,628±0,143	90,81±0,04	12	829117±14240	3,379±0,085	66,30±0,10
15	1115542±34360	4,542±0,253	89,12±0,07	15	742078±1127	3,026±0,739	59,37±0,55
18	1102646±2359	4,489±0,197	88,09±0,38	18	670943±5637	2,737±0,248	53,70±0,43
21	1079067±17659	4,394±0,235	86,21±0,42	21	589026±6877	2,404±1,052	47,18±1,24
24	1062455±3186	4,326±0,535	84,89±0,72	24	409090±25687	1,674±0,876	32,85±1,06
27	1056744±3506	4,303±0,199	84,43±0,39	27	407236±20877	1,666±0,850	32,70±1,04
30	1044320±4072	4,253±0,146	83,44±0,33	30	338842±22727	1,389±0,058	27,25±0,24



Rycina 68. Chromatogram świeżo sporządzonych 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IVbR.
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego



Rycina 69. Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IVbR po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu



Rycina 70. Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IVbR po 30 dniach przechowywania w temp. 20°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4-5- produkty rozkładu cefepimu

9. Skład, sposób sporządzania i właściwości fizykochemiczne rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% (w/w) kropli „przemysłowych”. Ocena skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej środków konserwujących w rozpuszczalnikach.

9.1. Skład rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% (w/w) kropli „przemysłowych”

Na podstawie wyników trwałości chemicznej cefepimu w wersjach recepturowych kropli, badanej metodą HPLC, zaprojektowano skład rozpuszczalników przeznaczonych do „przemysłowych”, dwuzbiornikowych wersji 1% i 5% (w/w) kropli z cefepimem. Skład rozpuszczalników przedstawiono w tabeli 53.

Tabela 53. Skład rozpuszczalników dla 1% i 5% kropli „przemysłowych” z cefepimem

Skład rozpuszczalników do „przemysłowych” wersji 1% i 5% kropli z cefepimem	Numer rozpuszczalnika								
	Rozpuszczalniki dla 1% kropli				Rozpuszczalniki dla 5% kropli				
	1	2	3	4	I	II	III	IV	
kwasy cytrynowy · H ₂ O	0,15	0,146	0,15	0,146	0,075	Rozpuszczalnik wyeliminowany z dalszych badań ze względu na interakcję z cefepimem.	0,075	0,073	
cytrynian sodu · 2H ₂ O	3,0	2,912	3,0	2,912	1,5		1,5	1,454	
roztwór alkoholu poliwinylowego (PVA) (lepkość = 43,21 mPa·s)	-	-	50,0	48,535	-				
roztwór alkoholu poliwinylowego (PVA) (lepkość = 17,21 mPa·s)	-	-			-			50,0	48,474
0,04% wodny roztwór boranu fenylortęciowego		2,525		2,525	-			-	2,632
alkohol β -fenyloetylowy		0,404		0,404	-			-	0,421
woda do iniekcji	do 100,0	do 100,0	do 100,0	do 100,0	do 100,0			do 100,0	do 100,0

9.2. Sposób sporządzania rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych”

Sporządzono roztwory buforów cytrynianowych, alkoholu poliwinylowego i roztwory środków konserwujących, według procedury opisanej w pkt. 4.1.- 4.3.

- **Rozpuszczalniki „przemysłowe” nr 1 i nr I**

Bufory cytrynianowe przesączono przez sączi ze szkła spiekanego Schott G-3, przelano do butelek infuzyjnych pojemności 100 ml, zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami. Rozpuszczalniki wyjałowiono w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 minut, przy nadciśnieniu 101,4 kPa.

- **Rozpuszczalnik „przemysłowy” nr 2**

Bufor cytrynianowy zakonserwowano roztworem pomocniczym boranu fenylortęciowego i alkoholem β -fenyloetylowym, przesączono przez sącze ze szkła spiekanego Schott G-3, przelano do butelek infuzyjnych pojemności 100 ml, zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami. Rozpuszczalniki wyjałowiono w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 minut, przy nadciśnieniu 101,4 kPa.

- **Rozpuszczalniki „przemysłowe” nr 3 i nr III**

Do roztworu alkoholu poliwinylowego dodawano stopniowo cały czas mieszając roztwór buforu cytrynianowego. Sporządzone rozpuszczalniki przesączono przez sącze ze szkła spiekanego Schott-G1, przelano do butelek infuzyjnych pojemności 100 ml, zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami. Rozpuszczalniki wyjałowiono w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 minut, przy nadciśnieniu 101,4 kPa.

- **Rozpuszczalniki „przemysłowe” nr 4 i nr IV**

Do roztworu alkoholu poliwinylowego dodawano stopniowo cały czas mieszając zakonserwowany roztwór buforu cytrynianowego. Sporządzone rozpuszczalniki przesączono przez sącze ze szkła spiekanego Schott G-1, przelano do butelek infuzyjnych pojemności 100 ml, zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami. Rozpuszczalniki wyjałowiono w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 minut, przy nadciśnieniu 101,4 kPa.

9.3. Ocena fizyczna rozpuszczalników przeznaczonych do kropli „przemysłowych” świeżo sporządzonych oraz poddanych testowi długoterminowemu oraz testowi przyspieszonego starzenia

Świeżo sporządzone, jałowe rozpuszczalniki poddano ocenie jakościowej: zbadano pH, ciśnienie osmotyczne oraz lepkość, dokonano także oceny organoleptycznej pod kątem przezroczystości, zabarwienia i zapachu. Rozpuszczalniki umieszczono w komorach klimatycznych Farmaceutycznej Spółdzielni Pracy „Filofarm” w Bydgoszczy. Rozpuszczalniki

przechowywano przez okres 6-ciu miesięcy w temperaturze $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, przy wilgotności $75\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ oraz przez okres 12 miesięcy w temperaturze $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, przy wilgotności $60\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$. W odstępach trzymiesięcznych prowadzono ocenę fizyczną rozpuszczalników pod kątem pH, ciśnienia osmotycznego, wyglądu oraz lepkości w przypadku rozpuszczalników zawierających w składzie alkohol poliwinylowy. Wyniki badań świeżo sporządzonych rozpuszczalników oraz w trakcie ich przechowywania przedstawiono w tabelach 54-56 i na rycinach 71-76.

Tabela 54. Ocena fizyczna rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% (w/w) kropli „przemysłowych” z cefepimem świeżo sporządzonych oraz w czasie testu długoterminowego po 3 i 6 miesiącach w temp. 25°C ± 2°C i RH 60% ± 5% RH

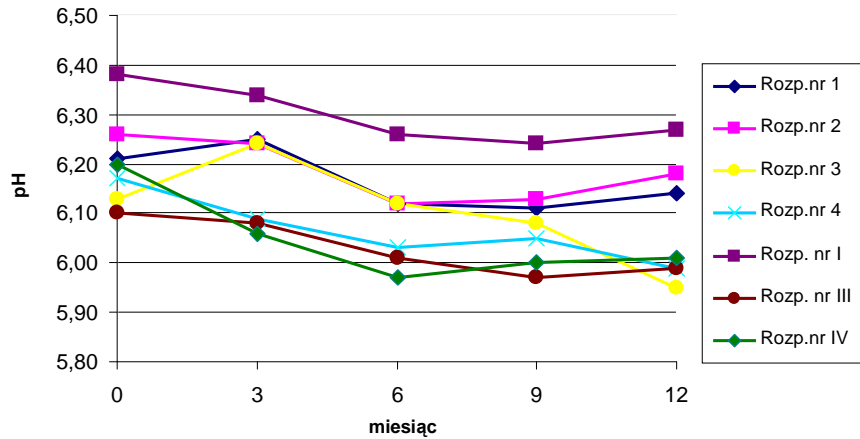
Nr rozpuszczalnika	Rozpuszczalnik świeżo sporządzony				Po 3 miesiącach temp. 25°C ± 2°C i RH 60% ± 5% RH				Po 6 miesiącach temp. 25°C ± 2°C i RH 60% ± 5% RH			
	pH	Ciśnienie osm. [mOsm/l]	Gęstość [g/cm ³]	Lepkość [mPa·s]	pH	Ciśnienie osm. [mOsm/l]	Gęstość [g/cm ³]	Lepkość [mPa·s]	pH	Ciśnienie osm. [mOsm/l]	Gęstość [g/cm ³]	Lepkość [mPa·s]
1	6,21 ± 0,01	300 ± 4	-	-	6,25 ± 0,01	306 ± 1	-	-	6,12 ± 0,02	303 ± 2,0	-	-
2	6,26 ± 0,02	337 ± 4	-	-	6,24 ± 0,02	339 ± 2	-	-	6,12 ± 0,02	334 ± 1	-	-
3	6,13 ± 0,01	343 ± 4	1,0232 ± 0,0001	7,88 ± 0,00	6,24 ± 0,02	339 ± 2	1,0248 ± 0,0001	8,32 ± 0,01	6,12 ± 0,02	334 ± 1	1,0253 ± 0,0001	8,69 ± 0,01
4	6,17 ± 0,00	367 ± 2	1,0223 ± 0,0000	7,47 ± 0,00	6,09 ± 0,01	380 ± 4	1,0240 ± 0,0002	8,15 ± 0,00	6,03 ± 0,01	379 ± 2	1,0247 ± 0,0001	8,52 ± 0,01
I	6,38 ± 0,00	159 ± 1	-	-	6,34 ± 0,02	163 ± 0	-	-	6,26 ± 0,01	162 ± 1	-	-
III	6,10 ± 0,01	181 ± 0	1,0119 ± 0,000	4,70 ± 0,00	6,08 ± 0,01	183 ± 1	1,0126 ± 0,0000	4,82 ± 0,00	6,01 ± 0,01	185 ± 2	1,0129 ± 0,0001	4,87 ± 0,00
IV	6,20 ± 0,01	240 ± 3	1,0145 ± 0,0000	4,55 ± 0,00	6,06 ± 0,01	224 ± 2	1,0130 ± 0,0000	4,91 ± 0,00	5,97 ± 0,02	222 ± 3	1,0131 ± 0,0002	4,93 ± 2,0
Wygląd	Wszystkie wersje rozpuszczalników po okresie 3 i 6 miesięcy przechowywania pozostały bezbarwne i przezroczyste.											

Tabela 55. Ocena fizyczna rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% (w/w) kropli „przemysłowych” z cefepimem świeżo sporządzonych oraz w czasie testu długoterminowego po 9 i 12 miesiącach w temp. 25°C ± 2°C i RH 60% ± 5% RH

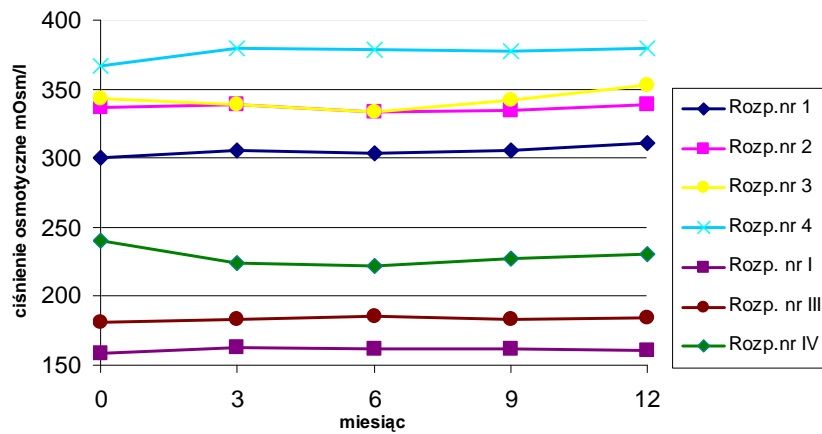
Nr rozpuszczalnika	Rozpuszczalnik świeżo sporządzony				Po 9 miesiącach temp. 25°C ± 2°C i RH 60% ± 5% RH				Po 12 miesiącach temp. 25°C ± 2°C i RH 60% ± 5% RH			
	pH	Ciśnienie osm. [mOsm/l]	Gęstość [g/cm ³]	Lepkość [mPa·s]	pH	Ciśnienie osm. [mOsm/l]	Gęstość [g/cm ³]	Lepkość [mPa·s]	pH	Ciśnienie osm. [mOsm/l]	Gęstość [g/cm ³]	Lepkość [mPa·s]
1	6,21 ± 0,01	300 ± 4	-	-	6,11 ± 0,01	306 ± 1,0	-	-	6,14 ± 0,02	311 ± 2,0	-	-
2	6,26 ± 0,02	337 ± 4	-	-	6,13 ± 0,01	335 ± 2	-	-	6,18 ± 0,02	339 ± 1	-	-
3	6,13 ± 0,01	343 ± 4	1,0232 ± 0,0001	7,88 ± 0,00	6,08 ± 0,00	342 ± 2	1,0242 ± 0,0001	8,72 ± 0,00	5,95 ± 0,01	353 ± 1	1,0235 ± 0,0000	8,79 ± 0,02
4	6,17 ± 0,00	367 ± 2	1,0223 ± 0,0000	7,47 ± 0,00	6,05 ± 0,01	378 ± 2	1,0239 ± 0,0000	8,50 ± 0,01	5,99 ± 0,01	380 ± 1	1,0227 ± 0,0001	8,53 ± 0,01
I	6,38 ± 0,00	159 ± 1	-	-	6,24 ± 0,00	162 ± 0	-	-	6,27 ± 0,01	161 ± 2	-	-
III	6,10 ± 0,01	181 ± 0	1,0119 ± 0,000	4,70 ± 0,00	5,97 ± 0,02	183 ± 1	1,0121 ± 0,0001	4,85 ± 0,01	5,99 ± 0,01	184 ± 3	1,0113 ± 0,0001	4,91 ± 0,02
IV	6,20 ± 0,01	240 ± 3	1,0145 ± 0,0000	4,55 ± 0,00	6,00 ± 0,01	227 ± 1	1,0121 ± 0,0002	4,95 ± 1,00	6,01 ± 0,01	230 ± 1	1,0114 ± 0,0001	4,92 ± 2,00
Wygląd	Wszystkie wersje rozpuszczalników po okresie 9 i 12 miesięcy przechowywania pozostały bezbarwne i przezroczyste.											

Tabela 56. Ocena fizyczna rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% (w/w) kropli „przemysłowych” z cefepimem świeżo sporządzonych oraz w czasie testu przyspieszonego po 3 i 6 miesiącach w temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH

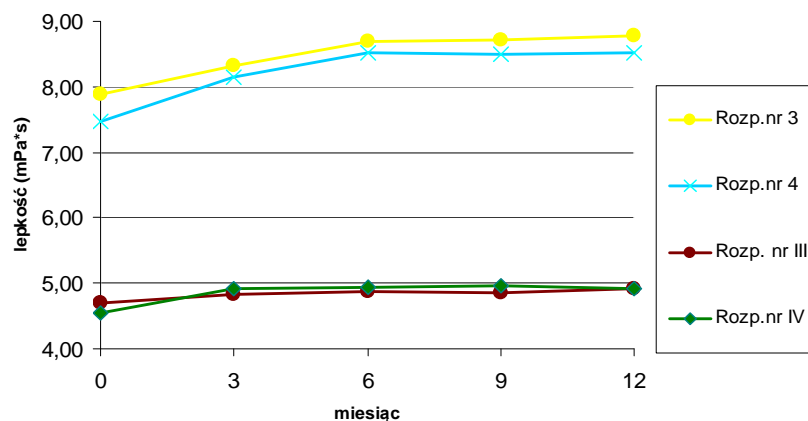
Nr rozpuszczalnika	Rozpuszczalnik świeżo sporządzony				Po 3 miesiącach temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH				Po 6 miesiącach temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH			
	pH	Ciśnienie osm. [mOsm/l]	Gęstość [g/cm ³]	Lepkość [mPa·s]	pH	Ciśnienie osm. [mOsm/l]	Gęstość [g/cm ³]	Lepkość [mPa·s]	pH	Ciśnienie osm. [mOsm/l]	Gęstość [g/cm ³]	Lepkość [mPa·s]
1	6,21 ± 0,01	300 ± 4	-	-	6,23 ± 0,02	307 ± 0	-	-	6,09 ± 0,00	306 ± 2	-	-
2	6,26 ± 0,02	337 ± 4	-	-	6,22 ± 0,02	339 ± 2	-	-	6,12 ± 0,00	337 ± 1	-	-
3	6,13 ± 0,01	343 ± 4	1,0232 ± 0,0001	7,88 ± 0,00	6,02 ± 0,01	356 ± 4	1,0247 ± 0,0002	8,15 ± 0,00	5,87 ± 0,02	363 ± 2	1,0238 ± 0,0001	8,68 ± 0,01
4	6,17 ± 0,00	367 ± 2	1,0223 ± 0,0000	7,47 ± 0,00	6,04 ± 0,01	386 ± 2	1,0241 ± 0,0001	8,40 ± 0,02	5,88 ± 0,02	388 ± 1	1,0232 ± 0,0001	8,46 ± 0,01
I	6,38 ± 0,00	159 ± 1	-	-	6,30 ± 0,01	163 ± 1	-	-	6,28 ± 0,00	162 ± 0	-	-
III	6,10 ± 0,01	181 ± 0	1,0119 ± 0,000	4,70 ± 0,00	6,20 ± 0,01	185 ± 0	1,0126 ± 0,0001	4,78 ± 0,01	6,05 ± 0,01	199 ± 1	1,0071 ± 0,0001	4,97 ± 0,00
IV	6,20 ± 0,01	240 ± 3	1,0145 ± 0,0000	4,55 ± 0,00	6,02 ± 0,01	229 ± 2	1,0130 ± 0,0001	4,89 ± 0,00	6,01 ± 0,01	234 ± 2	1,0124 ± 0,0001	4,96 ± 2,0
Wygląd	Wszystkie wersje rozpuszczalników po okresie 6 miesięcy przechowywania w warunkach przyspieszonego starzenia pozostały bezbarwne i przezroczyste.											



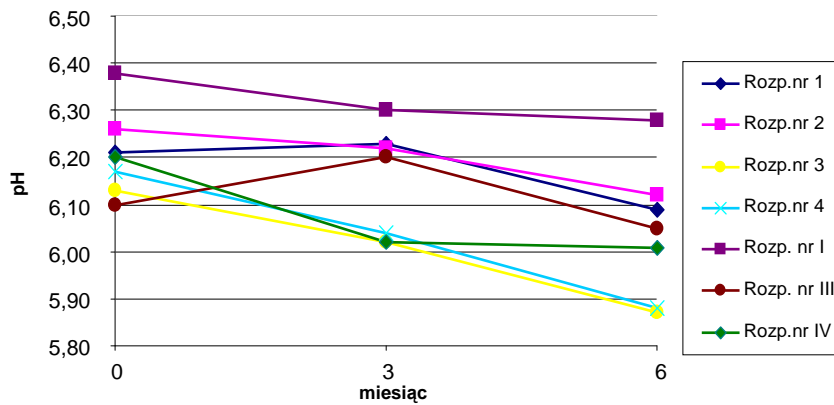
Rycina 71. Zmiany pH rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych” poddanych testowi długoterminowego starzenia w temp. $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i RH $60\% \pm 5\% \text{RH}$



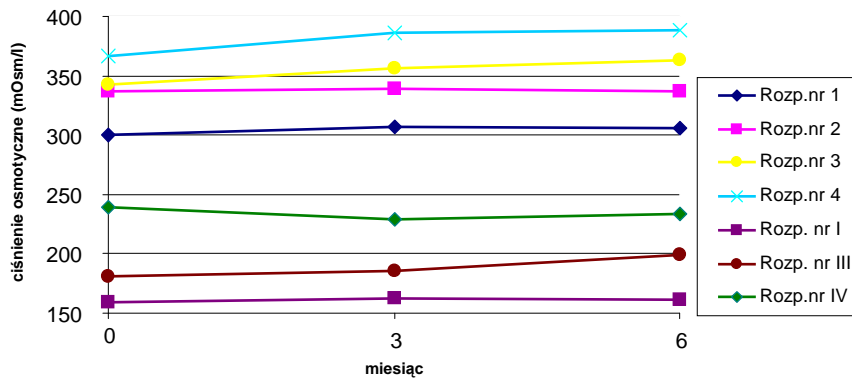
Rycina 72. Zmiany ciśnienia osmotycznego (mOsm/l) rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych” poddanych testowi długoterminowego starzenia w temp. $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i RH $60\% \pm 5\% \text{RH}$



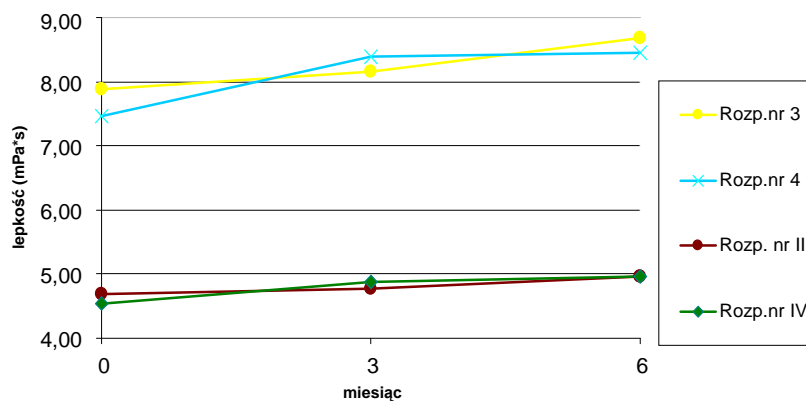
Rycina 73. Zmiany lepkości (mPa*s) rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych” poddanych testowi długoterminowego starzenia w temp. $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i RH $60\% \pm 5\% \text{RH}$



Rycina 74. Zmiany pH rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych” poddanych testowi przyspieszonego starzenia w temp. $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i $\text{RH } 75\% \pm 5\% \text{ RH}$



Rycina 75. Zmiany ciśnienia osmotycznego (mOsm/l) rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych” poddanych testowi przyspieszonego starzenia w temp. $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i $\text{RH } 75\% \pm 5\% \text{ RH}$



Rycina 76. Zmiany lepkości (mPa·s) rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych” poddanych testowi przyspieszonego starzenia w temp. $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i $\text{RH } 75\% \pm 5\% \text{ RH}$

9.4. Badanie skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej środków konserwujących w rozpuszczalnikach przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych”

Skuteczność środków konserwujących w rozpuszczalnikach „przemysłowych” po 12-stu miesiącach przechowywania w temperaturze $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ przy wilgotności $60\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ zbadano testem konserwacji zgodnie wymogami Farmakopei Polskiej VII [56,123] i procedurą opisaną we wcześniejszych badaniach [115].

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

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

Wymagane przez Farmakopeę Polską VII szczepy testowe zastosowane w badaniach to: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404. Test konserwacji został poszerzony o drobnoustroje nie ujęte w monografii 5.1.3. Farmakopei Polskiej VII tj. *Bacillus cereus* oraz *Listeria monocytogenes*.

Kryterium akceptacji dla testu skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej zgodnie z Farmakopeą Polską VII przedstawiono jako log redukcji liczby zdolnych do życia drobnoustrojów oraz jako stopień redukcji komórek w procentach, w stosunku do wartości uzyskanej dla inokulum. Wyniki testu konserwacji dla rozpuszczalników przeznaczonych dla wersji „przemysłowych” 1 % i 5 % kropli do oczu przedstawiono w tabelach 57-58.

Tabela 57. Wymagania dla testu konserwacji wg FP VII dla preparatów do oczu - kryterium A

Sposób przedstawienia wyniku		6 h	24 h	7 dni	28 dni
Bakterie	Log redukcji (FP VII)	2	3	-	BW ¹
	Stopień redukcji komórek (%)	99 %	99,90 %	-	100 %
Grzyby	Log redukcji (FP VII)	-	-	2	BN ²
	Stopień redukcji komórek (%)	-	-	99 %	

1 - BW – brak wzrostu zdolnych do życia drobnoustrojów

2 - BN – liczba drobnoustrojów nie zwiększa się

Tabela 58. Wyniki testu konserwacji dla rozpuszczalników nr 2, nr 4 i nr IV przeznaczonych do sporządzania 1 % i 5% kropli „przemysłowych”, po 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 25 °C ± 2 °C/60 % RH ± 5% RH

Szczepy testowe	Rozpuszczalnik nr 2				Rozpuszczalnik nr 4				Rozpuszczalnik nr IV			
	Stopień redukcji komórek											
	6 h	24 h	7 dni	28 dni	6 h	24 h	7 dni	28 dni	6 h	24 h	7 dni	28 dni
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,99 %	100 %	-	100 %	99,99 %	100 %	-	100 %	99,99 %	100 %	-	100 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	99,95 %	99,99 %	-	100 %	99,99 %	100 %	-	100 %	99,99 %	100 %	-	100 %
<i>Candida albicans</i>	-	-	100 %	100 %	-	-	99,99 %	100 %	-	-	99,99%	100 %
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	100 %	100%	-	-	99,99 %	100 %	-	-	99,99%	100 %
<i>Bacillus cereus</i>	99,99 %	99,99 %	-	99,99 %	99,85 %	99,90 %	-	99,99 %	99,80%	99,90 %	-	99,99 %
<i>Listeria monocytogenes</i>	99,97 %	100 %	-	100 %	99,99 %	99,99 %	-	100 %	99,99%	99,99 %	-	100 %

 Mieszanina konserwująca nie spełnia kryteriów farmakopealnych wg tabeli 57.

10. Aseptyczne sporządzanie i badanie 1% i 5% kropli „przemysłowych”

10.1. Skład 1% i 5% kropli „przemysłowych” z cefepimem

Tabela 59. Skład 1% i 5% kropli „ przemysłowych” z wykorzystaniem rozpuszczalników świeżo sporządzonych oraz poddanych procesowi przyspieszonego starzenia

Składniki (g) na 100 g kropli	1% krople „przemysłowe”				5% krople „przemysłowe”		
	1P0 i 1 P6	2P0 i 2P6	3P0 i 3P6	4P0 i 4P6	IP0 i IP6	IIIP0 i IIIP6	IVP0 i IVP6
Cefepim (dichlorowodorek cefepimu)	1,0	1,0	1,0	1,0	5,0	5,0	5,0
Maxipime inj.	1,725	1,725	1,725	1,725	8,625	8,625	8,625
Rozpuszczalnik 1	98,27	-	-	-	-	-	-
Rozpuszczalnik 2	-	98,27	-	-	-	-	-
Rozpuszczalnik 3	-	-	98,27	-	-	-	-
Rozpuszczalnik 4	-	-	-	98,27	-	-	-
Rozpuszczalnik I	-	-	-	-	91,37	-	-
Rozpuszczalnik III	-	-	-	-	-	91,37	-
Rozpuszczalnik IV	-	-	-	-	-	-	91,37

10.2. Tok postępowania przy sporządzaniu 1% i 5% „ przemysłowych” kropli z cefepimem

W warunkach aseptycznych do suchej, jałowej i wytarowanej zlewki odważono z dokładnością do 0,001 g przepisaną ilość Maxipime®inj. i dodano odpowiednią ilość rozpuszczalnika świeżo sporządzonego lub poddanego wcześniej procesowi przyspieszonego starzenia wg ICH [133]. Po rozpuszczeniu antybiotyku, krople przelano do butelek, zamknięto gumowymi korkami i metalowymi kapslami. Wszystkie wersje kropli „przemysłowych” wykonane zostały w dwóch równoległych seriach. Krople chronione od światła przechowywano w temperaturze 4°C przez 30 dni. Krople świeżo sporządzone oraz w czasie ich przechowywania poddano ocenie

fizykochemicznej obejmującej badania organoleptyczne, pH, ciśnienie osmotyczne oraz lepkość w przypadku wersji kropli ze zwiększoną lepkością. Stężenie cefepimu w kroplach zbadano według toku analitycznego opisanego w pkt. 8.8.1.

10.3. Ocena fizykochemiczna 1% i 5% kropli „przemysłowych” przygotowanych przy użyciu rozpuszczalników świeżo sporządzonych oraz poddanych testowi przyspieszonego starzenia (6 miesięcy w temp. $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i RH $75\% \pm 5\%$ RH)

10.3.1. Ocena organoleptyczna

Wyniki oceny organoleptycznej 1% i 5% kropli „przemysłowych” przytoczono w tabeli 60.

10.3.2. pH 1% i 5% kropli „przemysłowych”

Wyniki badań pH 1% i 5% kropli „przemysłowych” przytoczono w tabeli 61 i na rycinach 77-78.

10.3.3. Analiza ciśnienia osmotycznego w 1% i 5% kroplach „przemysłowych”

Wyniki analizy ciśnienia osmotycznego w 1% i 5% kroplach „przemysłowych” przytoczono w tabeli 62 i na rycinach 79-80.

10.3.4. Gęstość oraz lepkość 1% i 5% kropli „przemysłowych”

Wyniki badań gęstości i lepkości kropli 1% i 5% kropli „przemysłowych” przytoczono w tabeli 63.

10.3.5. Wyniki badań stężenia cefepimu w 1% i 5% kroplach „przemysłowych” z oceną statystyczną (trwałość cefepimu w kroplach „przemysłowych”)

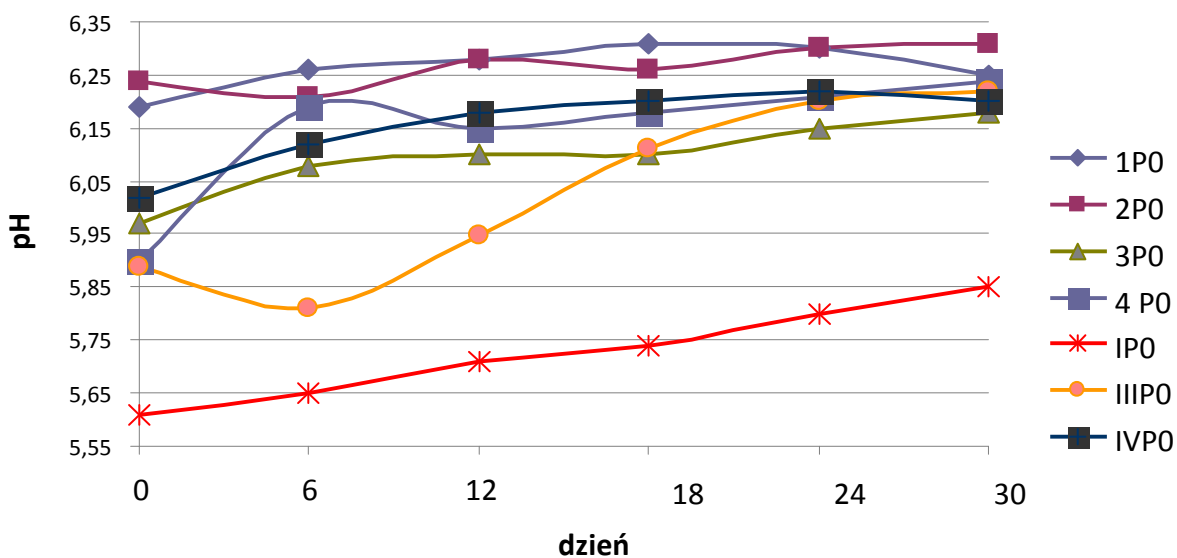
Metodę analityczną oraz równania regresji zastosowane w oznaczeniach stężenia cefepimu w kroplach „przemysłowych” przytoczono w pkt. 8.4. Analizę zawartości cefepimu w kroplach 1% i 5% określono według toku analitycznego przytoczonego w pkt. 8.8.1. Wyniki badań stężenia cefepimu w 1% i 5% kroplach „przemysłowych” przedstawiono w tabelach 64-77 i na rycinach 81-108. Porównanie trwałości cefepimu w 1% i 5% „przemysłowych” kroplach do oczu przygotowanych przy użyciu rozpuszczalników świeżo sporządzonych oraz rozpuszczalników poddanych testowi przyspieszonego starzenia przedstawiono w tabeli 78.

Tabela 60. Zapach, zabarwienie i przezroczystość 1% i 5% kropli „przemysłowych” przygotowanych przy użyciu rozpuszczalników świeżo sporządzonych (P0) oraz poddanych testowi przyspieszonego starzenia (P6) (6 miesięcy w temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH) przechowywanych w temperaturze 4°C

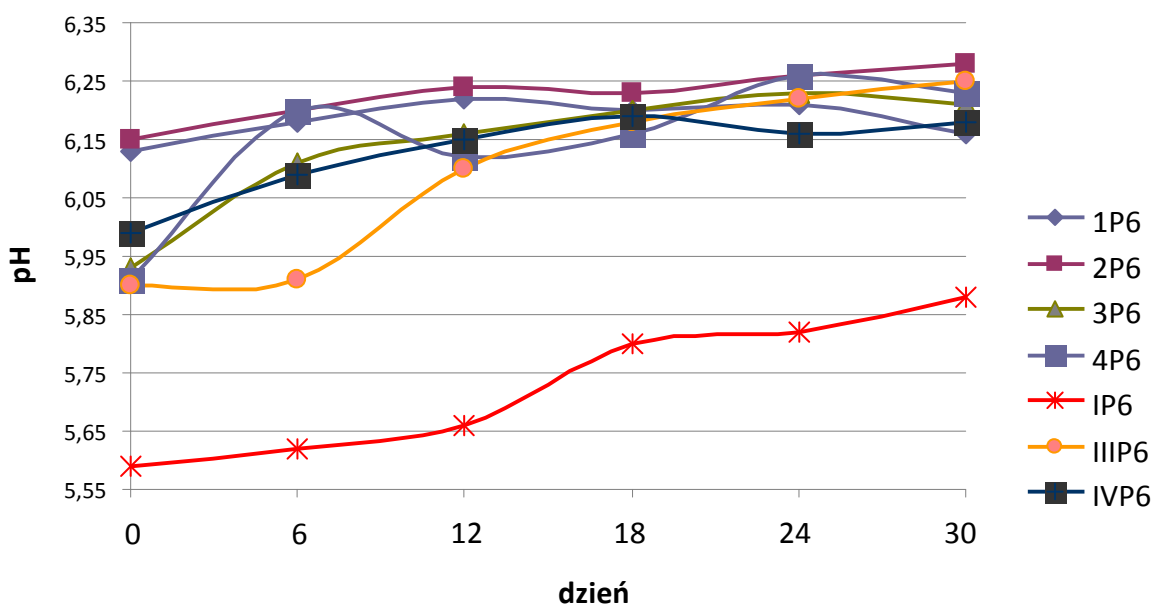
Symbole kropli „przemysłowych”	Krople świeżo sporządzone		Po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C.	
	Zabarwienie, przezroczystość	zapach	Zabarwienie, przezroczystość	zapach
1P0	bezbarwne, przezroczyste	antybiotyku	jasnożółte przezroczyste	zapach produktów rozkładu bardziej wyczuwalny
1P6	bezbarwne, przezroczyste	antybiotyku	jasnożółte przezroczyste	zapach produktów rozkładu bardziej wyczuwalny
2P0	bezbarwne, Przezroczyste	antybiotyku i konserwantu	jasnożółte przezroczyste	zapach produktów rozkładu i konserwantu
2P6	bezbarwne, przezroczyste	antybiotyku i konserwantu	jasnożółte przezroczyste	zapach produktów rozkładu i konserwantu
3P0	bezbarwne, przezroczyste	antybiotyku	jasnożółte przezroczyste	zapach produktów rozkładu bardziej wyczuwalny
3P6	bezbarwne, przezroczyste	antybiotyku	jasnożółte przezroczyste	zapach produktów rozkładu bardziej wyczuwalny
4P0	bezbarwne, przezroczyste	antybiotyku i konserwantu	jasnożółte przezroczyste	zapach produktów rozkładu i konserwantu
4P6	bezbarwne, przezroczyste	antybiotyku i konserwantu	jasnożółte przezroczyste	zapach produktów rozkładu i konserwantu
IP0	żółte, przezroczyste	antybiotyku	ciemnożółte, przezroczyste	zapach produktów rozkładu bardziej wyczuwalny
IP6	żółte, przezroczyste	antybiotyku	ciemnożółte, przezroczyste	zapach produktów rozkładu bardziej wyczuwalny
III P0	żółte, przezroczyste	antybiotyku	ciemnożółte, przezroczyste	zapach produktów rozkładu bardziej wyczuwalny
III P6	żółte, przezroczyste	antybiotyku	ciemnożółte, przezroczyste	zapach produktów rozkładu bardziej wyczuwalny
IV P0	żółte, przezroczyste	antybiotyku i konserwantu	ciemnożółte, przezroczyste	zapach produktów rozkładu i konserwantu
IV P6	żółte, przezroczyste	antybiotyku i konserwantu	ciemnożółte, przezroczyste	zapach produktów rozkładu i konserwantu

Tabela 61. pH 1% i 5% kropli „przemysłowych” przechowywanych w temperaturze 4°C, przygotowanych przy użyciu rozpuszczalników świeżo sporządzonych (P0) oraz poddanych testowi przyspieszonego starzenia (P6) (6 miesięcy w temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH)

Symbole kropli „przemysłowych”	Krople świeżo sporządzone	pH kropli przechowywanych w temp.4°C.				
		Po 6 dniach	Po 12 dniach	Po 18 dniach	Po 24 dniach	Po 30 dniach
1P0	6,19 ± 0,02	6,26 ± 0,01	6,28 ± 0,00	6,31 ±0,00	6,30 ± 0,01	6,25 ±0,02
1 P6	6,13 ± 0,01	6,18 ± 0,02	6,22 ± 0,05	6,20 ±0,00	6,21 ± 0,02	6,16 ±0,01
2P0	6,24 ± 0,00	6,21 ± 0,01	6,28 ± 0,05	6,26 ±0,01	6,30 ± 0,02	6,31 ±0,01
2P6	6,15 ± 0,00	6,20 ± 0,01	6,24 ± 0,00	6,23 ± 0,05	6,26 ± 0,00	6,28 ± 0,01
3P0	5,97 ± 0,02	6,08 ± 0,05	6,10 ± 0,01	6,10 ±0,01	6,15 ± 0,01	6,18 ± 0,01
3P6	5,93 ± 0,00	6,11 ± 0,01	6,16 ± 0,00	6,20 ±0,01	6,23 ± 0,01	6,21 ±0,01
4P0	5,90 ± 0,05	6,19 ± 0,01	6,15 ± 0,00	6,18 ±0,01	6,21 ± 0,00	6,24 ±0,02
4P6	5,91 ±0,01	6,20 ±0,00	6,12 ± 0,02	6,16 ± 0,00	6,26 ± 0,01	6,23 ±0,01
IP0	5,61 ± 0,00	5,65 ± 0,05	5,71 ± 0,00	5,74 ±0,01	5,80 ± 0,01	5,85 ±0,01
IP6	5,59 ± 0,01	5,62 ± 0,01	5,66 ± 0,00	5,80 ±0,01	5,82 ± 0,01	5,88 ±0,02
IIP0	5,89 ± 0,00	5,81 ± 0,02	5,95 ± 0,01	6,11 ±0,00	6,20 ± 0,01	6,22 ±0,01
IIP6	5,90 ±0,01	5,91 ± 0,01	6,10 ± 0,01	6,18 ± 0,00	6,22 ± 0,01	6,25 ±0,01
IVP0	6,02 ±0,00	6,12 ±0,00	6,18 ± 0,01	6,20 ±0,01	6,22 ± 0,01	6,20 ±0,01
IVP6	5,99 ±0,05	6,09 ± 0,01	6,15 ±0,01	6,19 ±0,00	6,16 ± 0,01	6,18 ±0,01



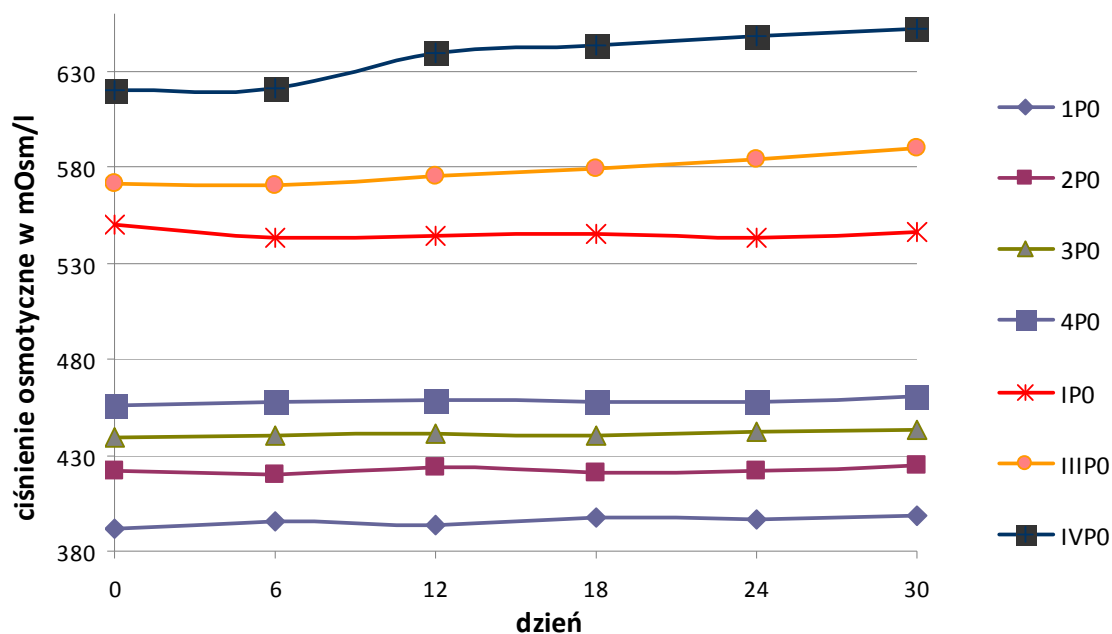
Rycina 77. pH 1% i 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji „przemysłowej” przygotowanych z zastosowaniem rozpuszczalników świeżo sporządzonych. Krople przechowywano przez 30 dni w temp. 4°C



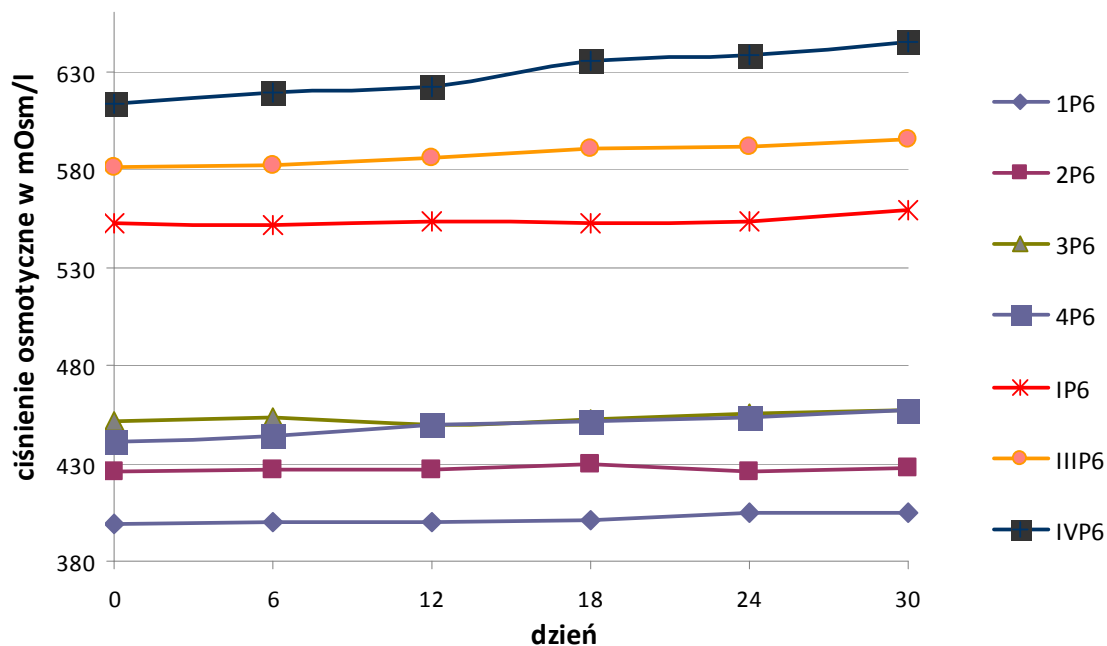
Rycina 78. pH 1% i 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji „przemysłowej” przygotowanych z zastosowaniem rozpuszczalników poddanych procesowi przyspieszonego starzenia (6 m-cy, temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH). Krople przechowywano przez 30 dni w temp. 4°C

Tabela 62. Ciśnienie osmotyczne 1% i 5% kropli „przemysłowych” przechowywanych w temperaturze 4°C przygotowanych na rozpuszczalnikach świeżo sporządzonych (P0) oraz poddanych testowi przyspieszonego starzenia (P6) (6 miesięcy w temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH)

Symbole kropli „przemysłowych”	Krople świeżo sporządzone	Ciśnienie osmotyczne (mOsm/l) kropli przechowywanych w temp.4°C.				
		Po 6 dniach	Po 12 dniach	Po 18 dniach	Po 24 dniach	Po 30 dniach
1P0	391 ±1	395 ± 1	394 ± 0,6	397 ± 0,6	397 ±0	398 ±1
1P6	399 ±0,6	400 ±1	400 ±1	401 ±1	405 ±1	404 ±1
2P0	422 ±1	420 ±1	423 ±1	421 ±1	422 ±1	424 ±1
2P6	425 ± 2	427 ± 1	427 ± 1	430 ± 1	425 ± 1	428 ± 1
3P0	439 ±1	440 ± 1	442 ±1	440 ±1	442 ±1	443 ±1
3P6	451 ± 0,6	453 ± 1	450 ± 1,2	452 ± 1	455 ± 1	457 ±1
4P0	456 ± 1	458 ± 1	459 ± 1	457 ± 1	458 ± 0	460 ± 1
4P6	441 ±0,6	444 ± 1	449 ±1	451 ±0	453 ±1	457 ±1
IP0	550 ± 2	543 ±1	544 ±11	545 ± 1	543 ±1	547 ± 1
IP6	552 ± 1	551 ±1	553 ± 1	553 ± 1	554 ±1	559 ± 11
III P0	571 ± 1	571 ± 1	576 ±1	580 ±1	584 ±1	590 ±1
III P6	581 ± 1	582 ± 1	585 ±21	590 ± 1	591 ± 6	596 ± 1
IV P0	620 ± 1	621 ± 1	640 ± 1	643 ±1	649 ± 0	652 ±1
IV P6	614 ± 1	619 ± 1	622 ±1	635 ±0	638 ±1	645 ±1



Rycina 79. Ciśnienie osmotyczne 1% i 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji „przemysłowej” przygotowanych z zastosowaniem rozpuszczalników świeżo sporządzonych. Krople przechowywano przez 30 dni w temp. 4°C



Rycina 80. Ciśnienie osmotyczne 1% i 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji „przemysłowej” przygotowanych z zastosowaniem rozpuszczalników poddanych procesowi przyspieszonego starzenia (6 m-cy, temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH). Krople przechowywano przez 30 dni w temp. 4°C

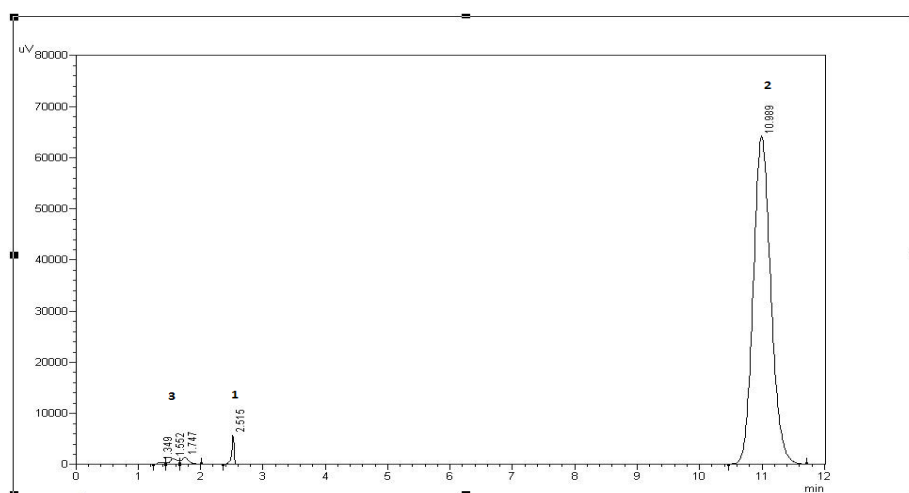
Tabela 63. Gęstość i lepkość 1% i 5% kropli „przemysłowych” przechowywanych w temperaturze 4°C przygotowanych przy użyciu rozpuszczalników świeżo sporządzonych (P0) oraz poddanych testowi przyspieszonego starzenia (P6) (6 miesięcy w temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH)

Symbole kropli „przemysłowych” ze zwiększoną lepkością	Krople świeżo sporządzone	Gęstość (g/cm ³) kropli po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C	Krople świeżo sporządzone	Lepkość (mPa·s) kropli po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C
3P0	1,0286 ±0,0001	1,0291 ±0,0001	9,14 ± 0,75	9,30 ± 0,35
3P6	1,0298 ±0,0001	1,0299 ±0,0000	9,35 ±1,19	9,89 ±0,38
4P0	1,0246 ±0,0001	1,0260 ±0,0001	8,25 ±0,45	8,36 ±0,25
4P6	1,0294 ±0,0001	1,0293 ±0,0002	9,53 ±0,87	9,28 ±0,02
IIP0	1,0401 ±0,0001	1,0440 ±0,0001	5,79 ±0,30	5,88 ±0,40
IIP6	1,0396 ±0,0001	1,0404 ±0,0001	5,78 ±0,14	5,91 ±0,30
IVP0	1,0381 ±0,0001	1,0392 ±0,0001	5,86 ±0,20	5,91 ±0,30
IVP6	1,0401 ±0,0001	1,0405 ±0,0001	5,91 ±0,03	5,67 ±0,11

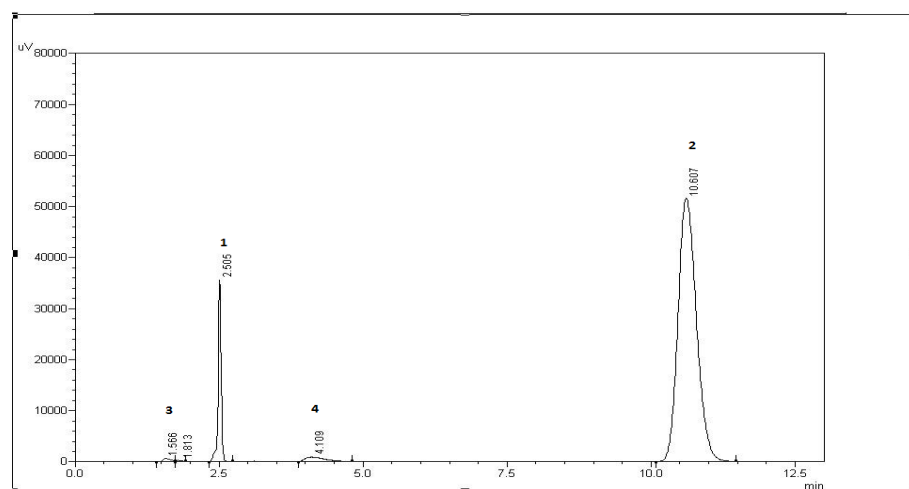
Tabela 64. Wyniki badań zawartości cefepimu w 1% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (1P0) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika, wraz z oceną statystyczną

Wersja 1P0, średnia dla serii 1 i serii 2

Dzień	Średnie pole powierzchni piku cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)
0	1253714 ± 10781	1,011 ± 0,052	100,00
3	1250420 ± 1702	1,008 ± 0,000	99,74 ± 0,05
6	1215059 ± 6247	0,980 ± 0,397	96,95 ± 0,33
9	1211249 ± 8445	0,977 ± 0,025	96,65 ± 0,03
12	1202531 ± 7113	0,970 ± 0,100	95,97 ± 0,15
15	1183381 ± 8635	0,955 ± 0,476	94,46 ± 0,40
18	1148352 ± 5837	0,927 ± 0,057	91,70 ± 0,10
21	1141555 ± 10347	0,921 ± 0,134	91,16 ± 0,07
24	1138057 ± 87307	0,919 ± 0,317	90,89 ± 0,33
27	1131735 ± 86597	0,914 ± 0,171	90,39 ± 0,20
30	1077454 ± 3969	0,870 ± 0,073	86,11 ± 0,11



**Rycina 81. Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 1P0 bezpośrednio po przygotowaniu przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika.
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego**

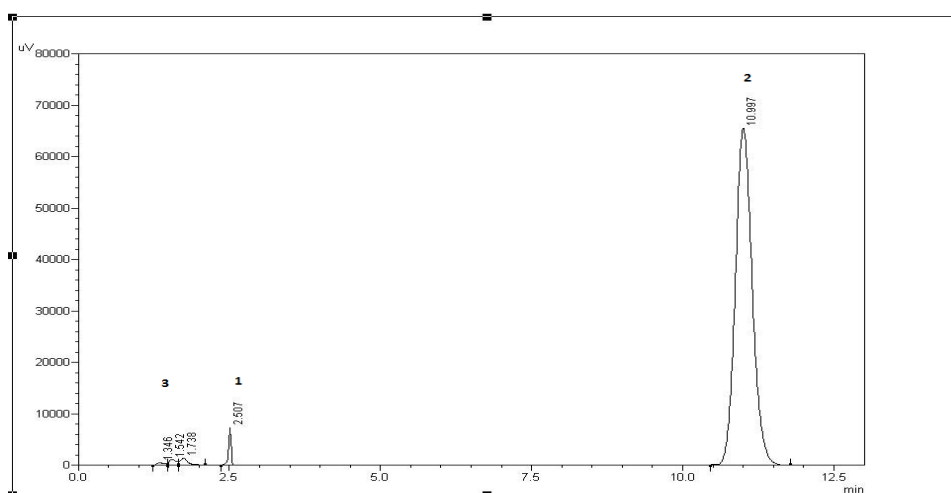


**Rycina 82. Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 1P0 po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C.
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu**

Tabela 65. Wyniki badań zawartości cefepimu w 1% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (2P0) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika, wraz z oceną statystyczną

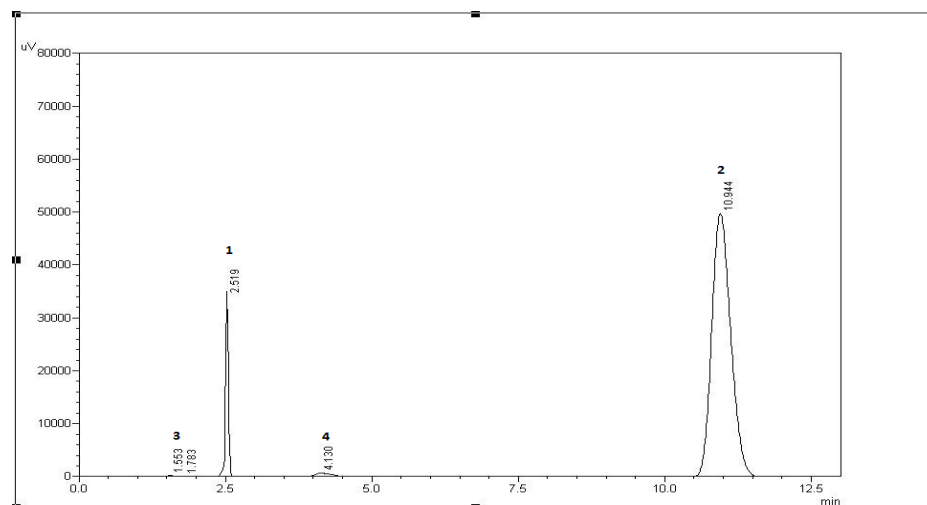
Wersja 2P0, średnia dla serii 1 i serii 2

Dzień	Średnie pole powierzchni piku cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)
0	1268556 ± 4984	1,023 ± 0,024	100,00
3	1248177 ± 16184	1,006 ± 0,228	98,41 ± 0,25
6	1217875 ± 50694	0,982 ± 0,010	96,05 ± 0,01
9	1209860 ± 99974	0,976 ± 0,079	95,43 ± 0,05
12	1203926 ± 3167	0,971 ± 0,435	94,97 ± 0,39
15	1181104 ± 10090	0,953 ± 0,973	93,19 ± 0,93
18	1172435 ± 8736	0,946 ± 0,052	92,51 ± 0,07
21	1135421 ± 5100	0,916 ± 0,003	89,63 ± 0,02
24	1123965 ± 2944	0,907 ± 0,082	88,74 ± 0,09
27	1095419 ± 5430	0,885 ± 0,648	86,51 ± 0,58
30	940756 ± 6740	0,761 ± 0,699	74,47 ± 0,50



Rycina 83. Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 2P0 bezpośrednio po przygotowaniu przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika

1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego



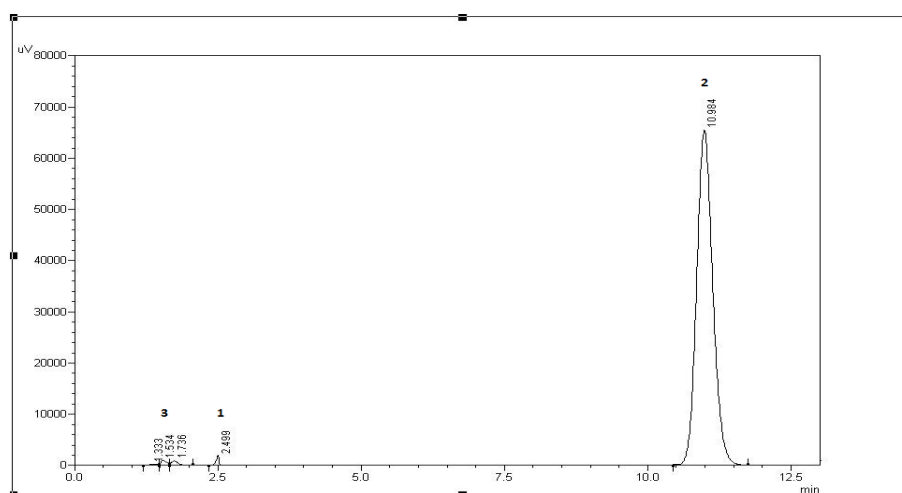
Rycina 84. Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 2P0 po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C

1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu

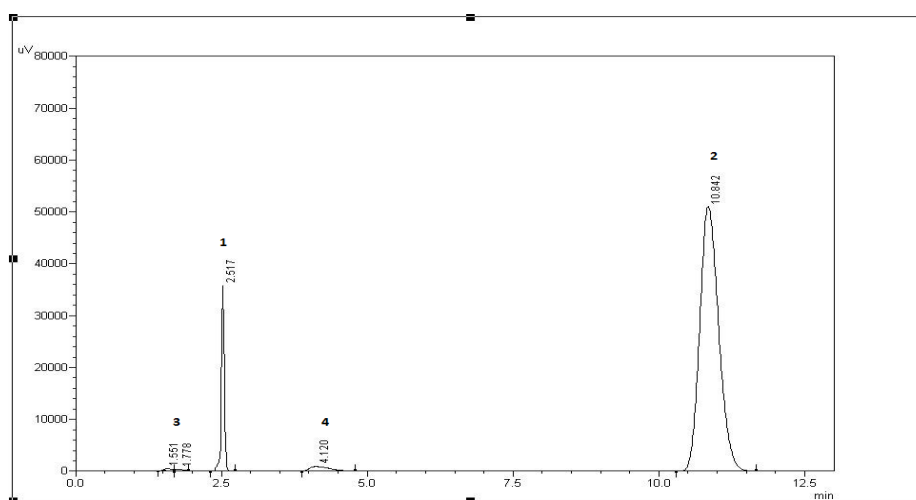
Tabela 66. Wyniki badań zawartości cefepimu w 1% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (3P0) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika, wraz z oceną statystyczną

Wersja 3P0, średnia dla serii 1 i serii 2

Dzień	Średnie pole powierzchni piku cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości + SD (%)
0	1275327 ± 4112	1,028 ± 0,118	100,00
3	1259333 ± 7892	1,015 ± 0,090	98,76 ± 0,03
6	1258772 ± 8666	1,015 ± 0,024	98,72 ± 0,09
9	1254578 ± 5945	1,011 ± 0,290	98,39 ± 0,40
12	1224203 ± 2895	0,987 ± 0,028	96,04 ± 0,14
15	1193527 ± 6849	0,963 ± 0,076	93,66 ± 0,18
18	1168665 ± 2808	0,943 ± 0,028	91,74 ± 0,13
21	1162793 ± 9709	0,938 ± 0,262	91,28 ± 0,13
24	1153913 ± 3270	0,931 ± 0,196	90,59 ± 0,28
27	1119968 ± 102870	0,904 ± 0,534	87,96 ± 0,37
30	1103331 ± 8916	0,891 ± 0,091	86,67 ± 0,02



Rycina 85. Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 3P0 bezpośrednio po przygotowaniu przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego

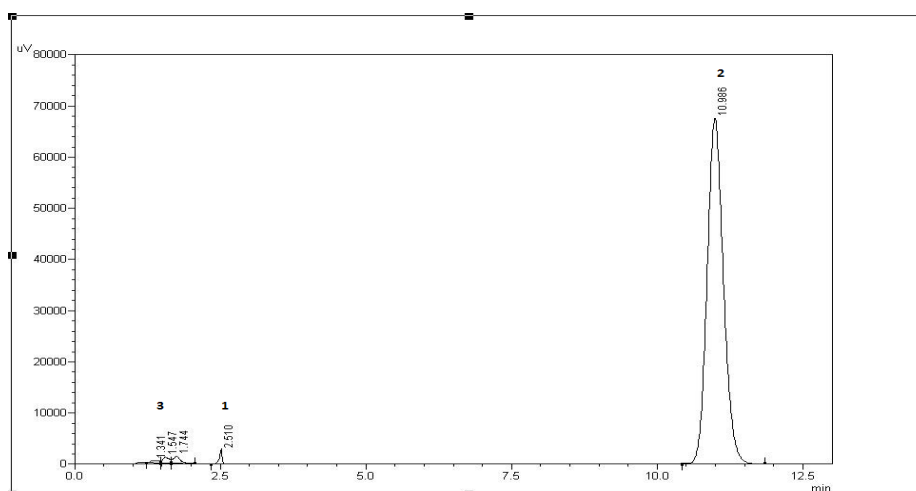


Rycina 86. Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 3P0 po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu

Tabela 67. Wyniki badań zawartości cefepimu w 1% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (4P0) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika, wraz z oceną statystyczną

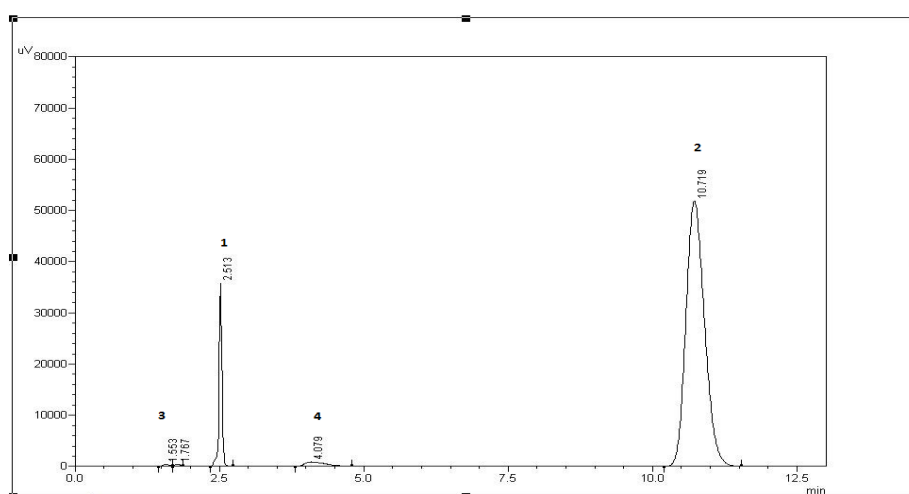
Wersja 4P0, średnia dla serii 1 i serii 2

Dzień	Średnie pole powierzchni piku cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości + SD (%)
0	1296758 ± 9484	1,045 ± 0,623	100,00
3	1291607 ± 66594	1,041 ± 0,415	99,61 ± 0,21
6	1263294 ± 77474	1,018 ± 0,924	97,45 ± 0,29
9	1239930 ± 112654	1,000 ± 0,178	95,67 ± 0,43
12	1222226 ± 78054	0,986 ± 0,036	94,32 ± 0,55
15	1195226 ± 104954	0,964 ± 0,092	92,26 ± 0,49
18	1181431 ± 33804	0,953 ± 0,188	91,21 ± 0,40
21	1169242 ± 112294	0,943 ± 0,245	90,28 ± 0,78
24	1158794 ± 4871	0,935 ± 0,012	89,48 ± 0,57
27	1124979 ± 45270	0,908 ± 0,968	86,91 ± 0,30
30	1047125 ± 6748	0,846 ± 0,472	80,97 ± 0,12



Rycina 87. Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 4P0 bezpośrednio po przygotowaniu przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika

1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego



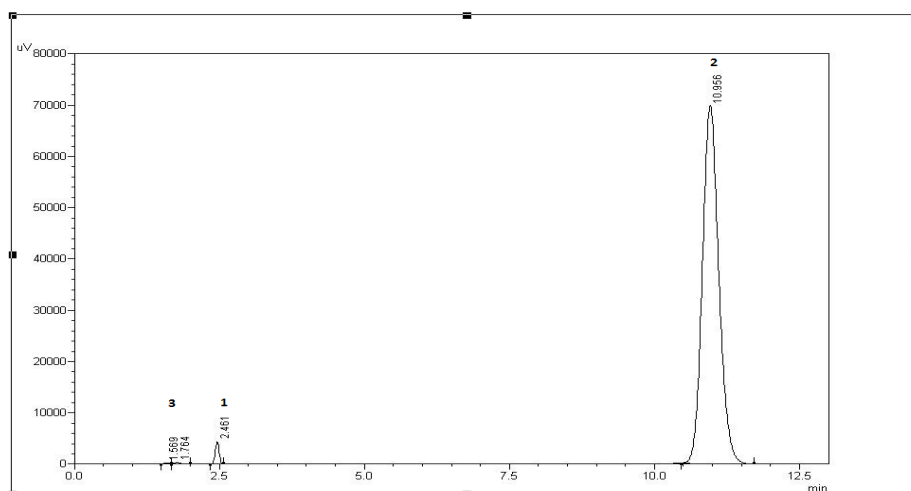
Rycina 88. Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 4P0 po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C

1-uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu

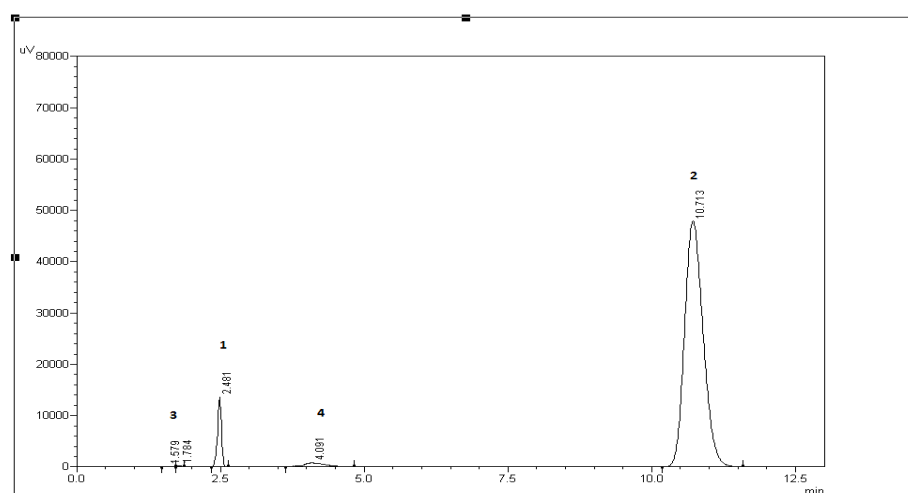
Tabela 68. Wyniki badań zawartości cefepimu w 5% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (IP0) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika, wraz z oceną statystyczną

Wersja IP0, średnia dla serii 1 i serii 2

Dzień	Średnie pole powierzchni piku cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości + SD (%)
0	1283669 ± 12282	5,173 ± 0,000	100,00
3	1268162 ± 11034	5,111 ± 0,009	98,81 ± 0,83
6	1231896 ± 13777	4,967 ± 0,002	96,01 ± 0,22
9	1194925 ± 7502	4,819 ± 0,085	93,17 ± 0,23
12	1185567 ± 2190	4,782 ± 0,034	92,45 ± 0,31
15	1170157 ± 2811	4,721 ± 0,004	91,26 ± 0,42
18	1156881 ± 26507	4,668 ± 0,072	90,24 ± 0,97
21	1129574 ± 8397	4,559 ± 0,009	88,14 ± 0,85
24	1099353 ± 6150	4,439 ± 0,054	85,81 ± 0,21
27	1075786 ± 1916	4,345 ± 0,012	84,00 ± 1,13
30	1014548 ± 8671	4,101 ± 0,096	79,28 ± 0,26



Rycina 89. Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IP0 bezpośrednio po przygotowaniu przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego

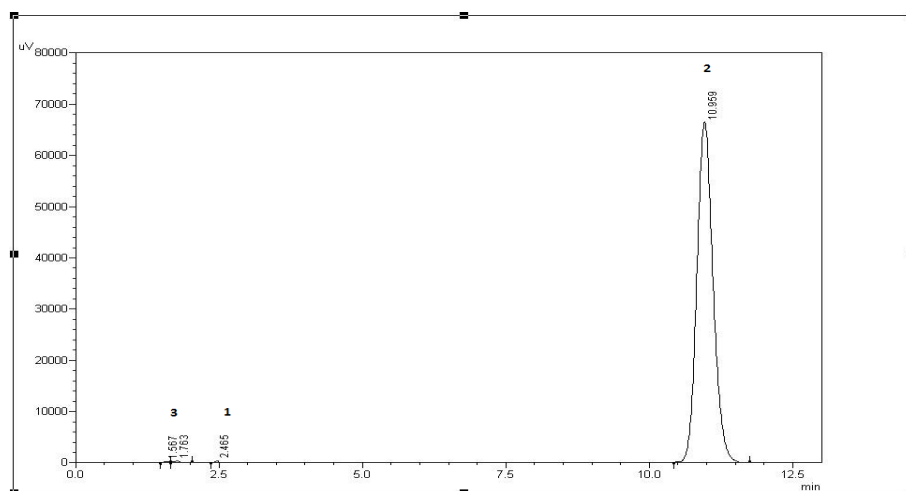


Rycina 90. Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IP0 po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu

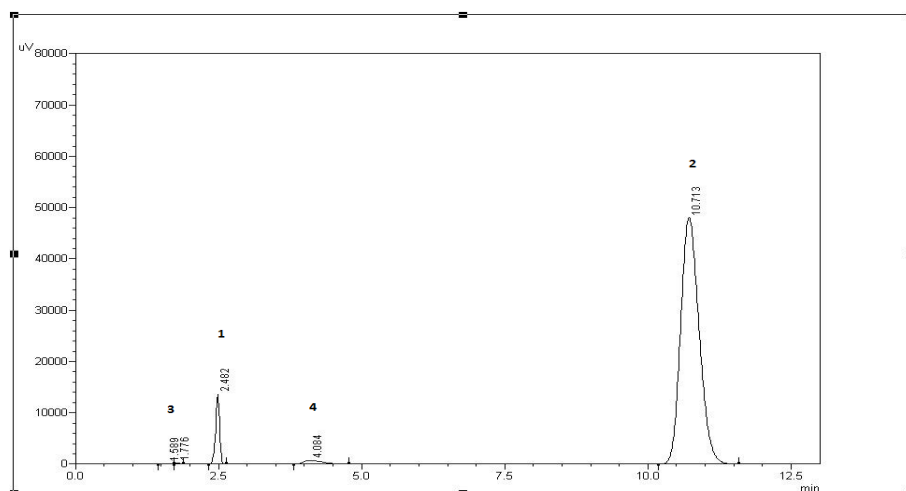
Tabela 69. Wyniki badań zawartości cefepimu w 5% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (IIP0) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika, wraz z oceną statystyczną

Wersja IIP0, średnia dla serii 1 i serii 2

Dzień	Średnie pole powierzchni piku cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości + SD (%)
0	1300185 ± 4523	5,239 ± 0,000	100,00
3	1238840 ± 347033	4,994 ± 0,957	95,34 ± 0,56
6	1272118 ± 336893	5,127 ± 0,066	97,87 ± 0,32
9	1238517 ± 80756	4,993 ± 0,125	95,31 ± 0,59
12	1229081 ± 9517	4,956 ± 0,064	94,59 ± 0,30
15	1189703 ± 31798	4,799 ± 0,198	91,60 ± 0,91
18	1163047 ± 4553	4,693 ± 0,073	89,57 ± 0,33
21	1135205 ± 8167	4,582 ± 0,152	87,46 ± 0,67
24	1084887 ± 27682	4,381 ± 0,635	83,63 ± 0,65
27	1077343 ± 1434	4,351 ± 0,004	83,06 ± 0,02
30	965125 ± 11190	3,904 ± 0,417	74,53 ± 1,05



Rycina 91. Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IIP0 bezpośrednio po przygotowaniu przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego

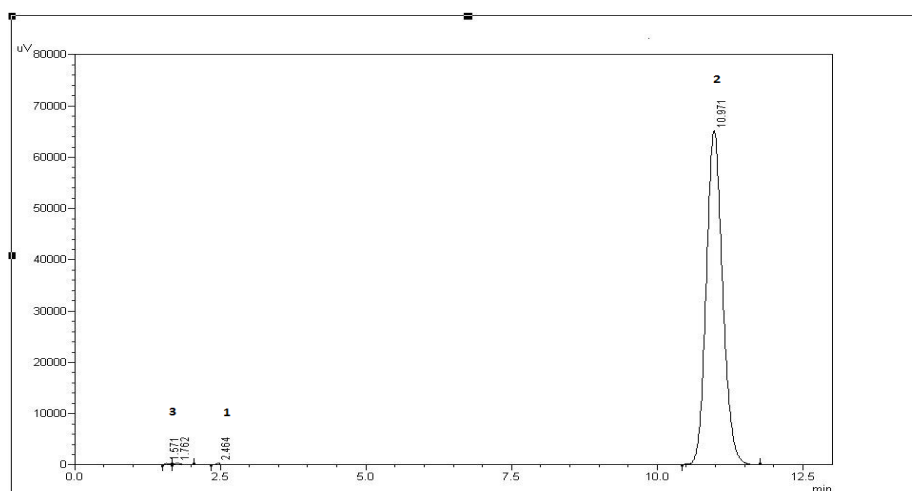


Rycina 92. Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IIP0 po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu

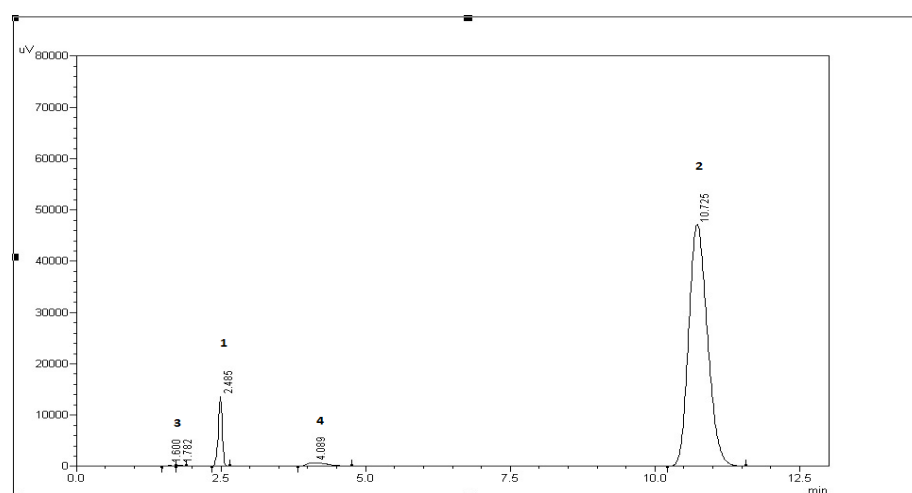
Tabela 70. Wyniki badań zawartości cefepimu w 5% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (IVP0) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika, wraz z oceną statystyczną

Wersja IVP0, średnia dla serii 1 i serii 2

Dzień	Średnie pole powierzchni piku cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości + SD (%)
0	1265783 ± 6647	5,102 ± 0,000	100,00
3	1243304 ± 14811	5,012 ± 0,069	98,25 ± 0,34
6	1221120 ± 7246	4,924 ± 0,070	96,51 ± 0,34
9	1216460 ± 24781	4,905 ± 0,010	96,15 ± 0,05
12	1169020 ± 16320	4,716 ± 0,128	92,45 ± 0,59
15	1159230 ± 9479	4,677 ± 0,089	91,68 ± 0,41
18	1146372 ± 18066	4,626 ± 0,083	90,68 ± 0,37
21	1113747 ± 19502	4,496 ± 0,041	88,13 ± 0,18
24	1058186 ± 4258	4,275 ± 0,052	83,79 ± 0,22
27	1050520 ± 52936	4,244 ± 0,001	83,20 ± 0,05
30	911294 ± 42572	3,690 ± 0,014	72,33 ± 0,05



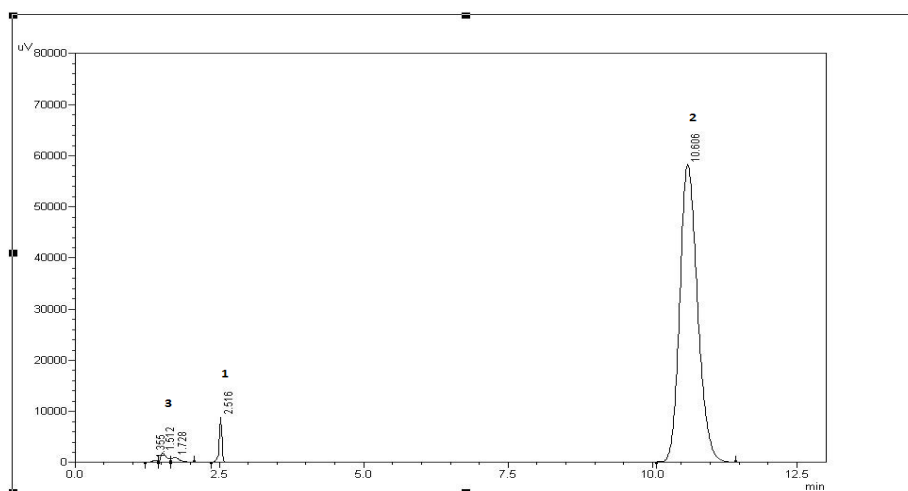
Rycina 93. Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IVP0 bezpośrednio po przygotowaniu przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego



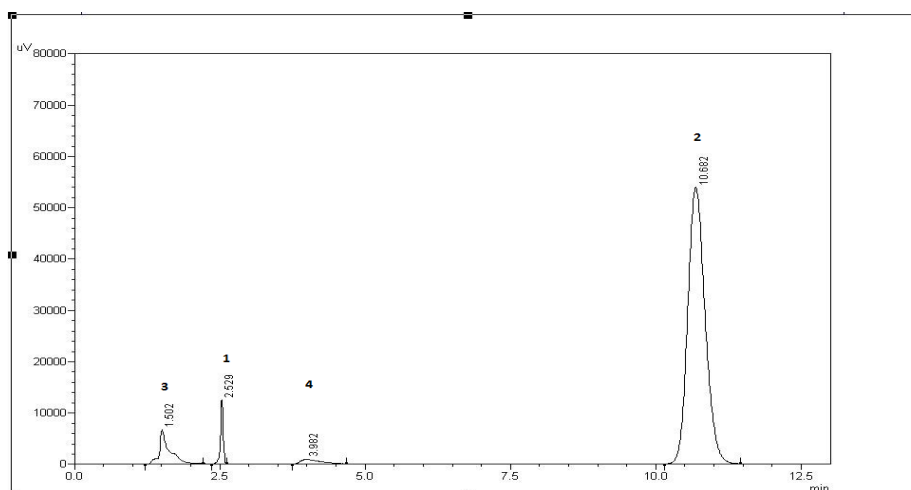
Rycina 94. Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IVP0 po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu

Tabela 71. Wyniki badań zawartości cefepimu w 1% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (1P6) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu rozpuszczalnika przemysłowego poddanego testowi przyspieszonego starzenia, wraz z oceną statystyczną

Wersja 1P6, średnia dla serii 1 i serii 2			
Dzień	Średnie pole powierzchni piku cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości ± SD (%)
0	1267662 ± 13330	1,034 ± 0,578	100,00
3	1258719 ± 6585	1,027 ± 1,059	99,30 ± 0,48
6	1233132 ± 10556	1,006 ± 0,036	97,28 ± 0,53
9	1225023 ± 6420	0,999 ± 0,076	96,64 ± 0,48
12	1217257 ± 1490	0,993 ± 0,142	96,03 ± 0,69
15	1213737 ± 3647	0,990 ± 0,115	95,75 ± 0,44
18	1195885 ± 2673	0,976 ± 0,056	94,35 ± 0,49
21	1175290 ± 6745	0,959 ± 0,925	92,73 ± 1,09
24	1154224 ± 6507	0,942 ± 0,515	91,07 ± 0,06
27	1121659 ± 2435	0,915 ± 0,051	88,50 ± 0,47
30	1114727 ± 7715	0,909 ± 0,843	87,96 ± 1,05



Rycina 95. Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 1P6 bezpośrednio po przygotowaniu na rozpuszczalniku poddanemu testowi przyspieszonego starzenia
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego

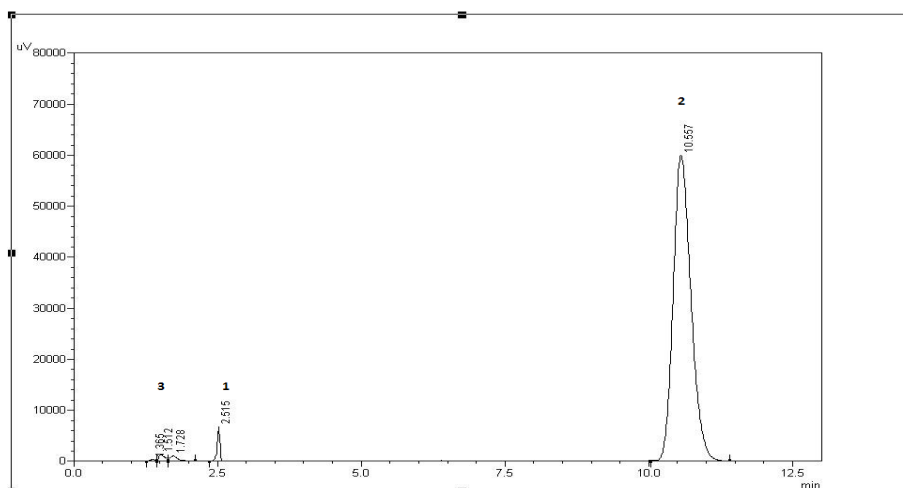


Rycina 96. Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 1P6 po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu

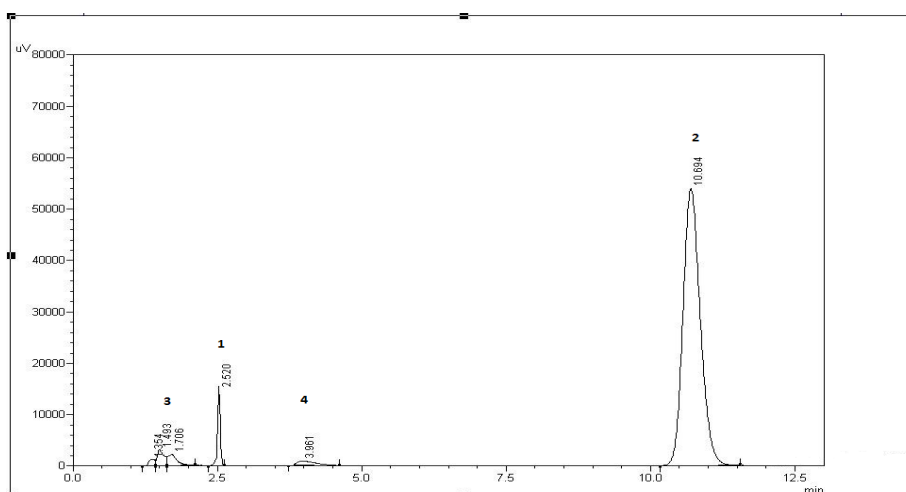
Tabela 72. Wyniki badań zawartości cefepimu w 1% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (2P6) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu rozpuszczalnika przemysłowego poddanego testowi przyspieszonego starzenia, wraz z oceną statystyczną

Wersja 2P6, średnia dla serii 1 i serii 2

Dzień	Średnie pole powierzchni piku cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości + SD (%)
0	1273274 ± 12644	1,039 ± 0,029	100,00
3	1258120 ± 12964	1,026 ± 0,165	98,81 ± 0,13
6	1253748 ± 11883	1,023 ± 0,070	98,47 ± 0,09
9	1223525 ± 11217	0,998 ± 0,007	96,10 ± 0,02
12	1212569 ± 12129	0,989 ± 0,041	95,24 ± 0,01
15	1207851 ± 9006	0,985 ± 0,152	94,87 ± 0,12
18	1204136 ± 11319	0,982 ± 0,033	94,58 ± 0,06
21	1158364 ± 11640	0,945 ± 0,082	90,99 ± 0,10
24	1119486 ± 11024	0,913 ± 0,091	87,94 ± 0,10
27	1117656 ± 12250	0,912 ± 0,020	87,80 ± 0,01
30	1099045 ± 11884	0,897 ± 0,836	86,34 ± 0,67



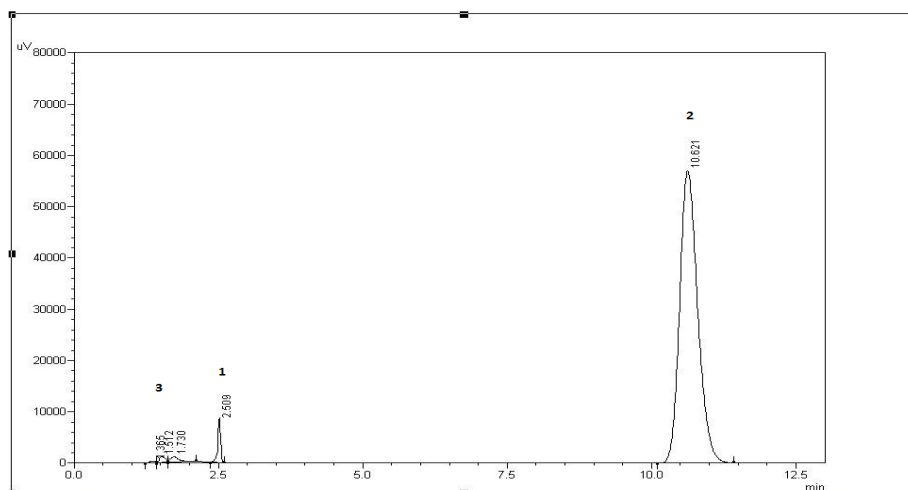
**Rycina 97. Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 2P6 bezpośrednio po przygotowaniu na rozpuszczalniku poddanemu testowi przyspieszonego starzenia
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego**



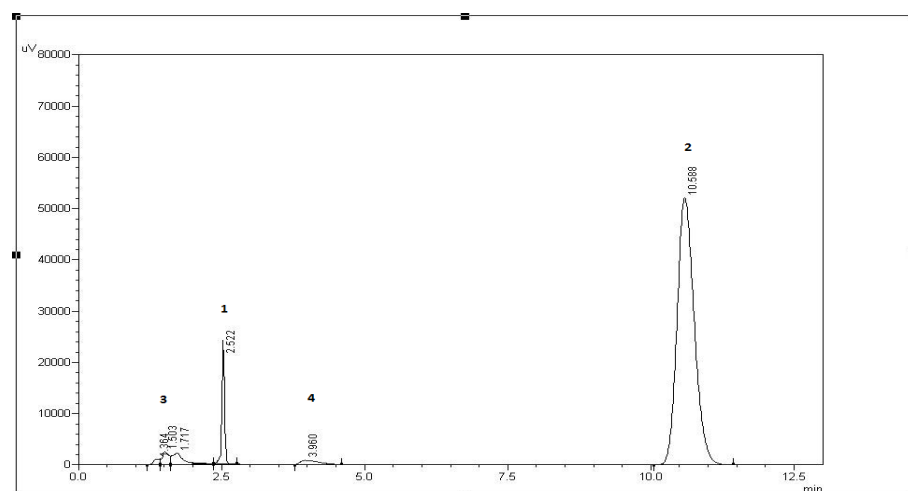
**Rycina 98. Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 2P6 po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C
1-uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu**

Tabela 73. Wyniki badań zawartości cefepimu w 1% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (3P6) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu rozpuszczalnika przemysłowego poddanego testowi przyspieszonego starzenia, wraz z oceną statystyczną

Wersja 3P6, średnia dla serii 1 i serii 2			
Dzień	Średnie pole powierzchni piku cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości + SD (%)
0	1265665 ± 11096	1,032 ± 0,211	100,00
3	1246624 ± 4418	1,017 ± 0,305	98,50 ± 0,51
6	1243659 ± 13616	1,014 ± 0,063	98,26 ± 0,27
9	1224500 ± 6043	0,999 ± 0,203	96,75 ± 0,08
12	1220706 ± 8114	0,996 ± 0,229	96,45 ± 0,02
15	1216190 ± 8255	0,992 ± 0,329	96,10 ± 0,11
18	1193801 ± 1919	0,974 ± 0,128	94,33 ± 0,08
21	1193629 ± 11108	0,974 ± 0,150	94,32 ± 0,34
24	1164454 ± 4881	0,950 ± 0,004	92,02 ± 0,2
27	1124050 ± 1102	0,917 ± 0,109	88,83 ± 0,28
30	1088028 ± 2049	0,888 ± 0,008	85,99 ± 0,17



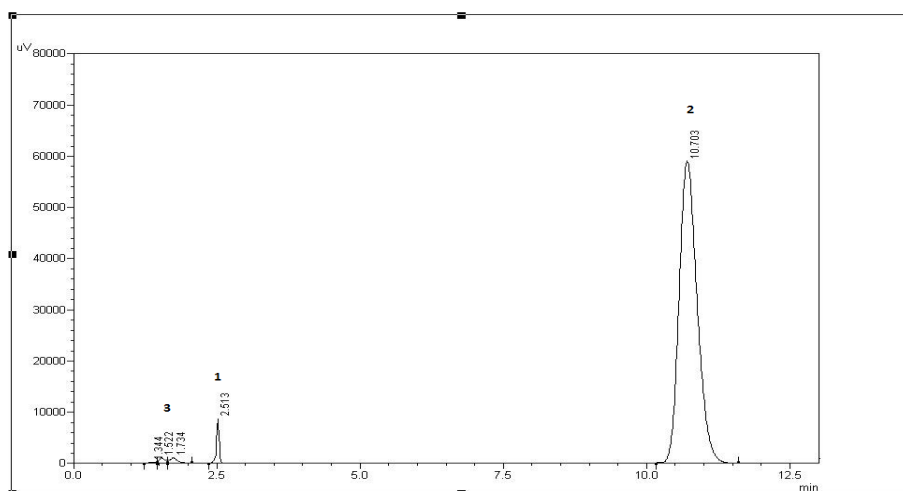
**Rycina 99. Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 3P6 bezpośrednio po przygotowaniu na rozpuszczalniku poddanemu testowi przyspieszonego starzenia
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego**



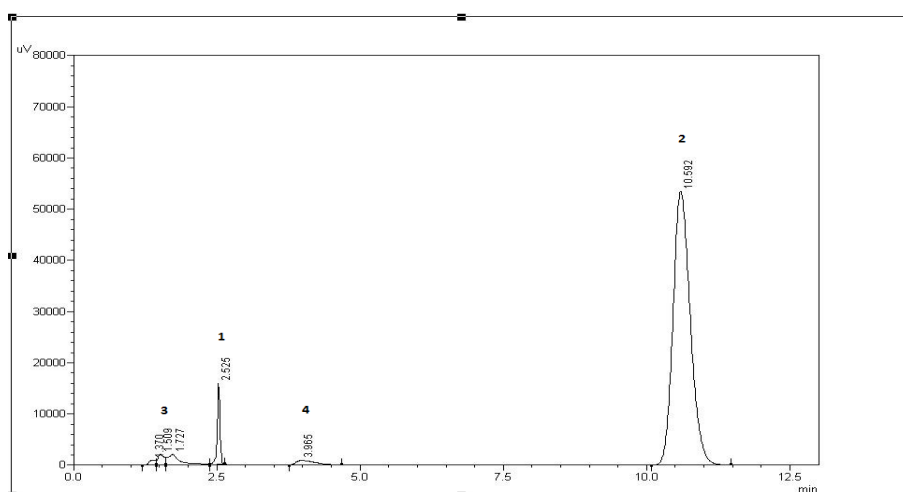
**Rycina 100. Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 3P6 po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C.
1-uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu**

Tabela 74. Wyniki badań zawartości cefepimu w 1% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (4P6) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu rozpuszczalnika przemysłowego poddanego testowi przyspieszonego starzenia, wraz z oceną statystyczną

Wersja 4P6, średnia dla serii 1 i serii 2			
Dzień	Średnie pole powierzchni piku cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości + SD (%)
0	1294976 ± 1005	1,056 ± 0,099	100,00
3	1261713 ± 91475	1,029 ± 0,469	97,44 ± 0,36
6	1256441 ± 6790	1,025 ± 0,020	97,03 ± 0,08
9	1236280 ± 12605	1,008 ± 0,023	95,48 ± 0,12
12	1214155 ± 11435	0,990 ± 0,020	93,77 ± 0,11
15	1203936 ± 11975	0,982 ± 0,002	92,98 ± 0,09
18	1194922 ± 10591	0,975 ± 0,024	92,29 ± 0,11
21	1177957 ± 11444	0,961 ± 0,116	90,98 ± 0,19
24	1163799 ± 4571	0,949 ± 0,031	89,89 ± 0,06
27	1124133 ± 1054	0,917 ± 0,015	86,83 ± 0,10
30	1113513 ± 5798	0,908 ± 0,376	86,01 ± 0,41



**Rycina 101. Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 4P6 bezpośrednio po przygotowaniu na rozpuszczalniku poddanemu testowi przyspieszonego starzenia
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego**

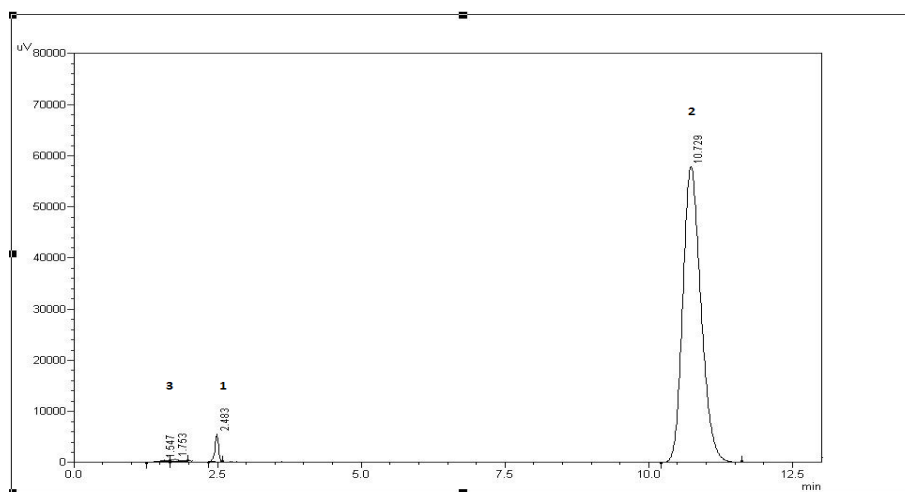


**Rycina 102. Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 4P6 po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu**

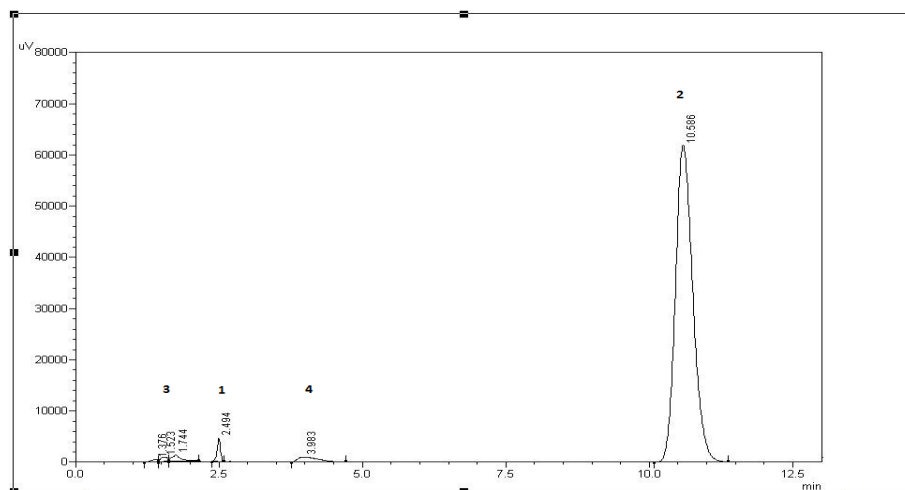
Tabela 75. Wyniki badań zawartości cefepimu w 5% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (IP6) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu rozpuszczalnika przemysłowego poddanego testowi przyspieszonego starzenia, wraz z oceną statystyczną

Wersja IP6, średnia dla serii 1 i serii 2

Dzień	Średnie pole powierzchni piku cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości + SD (%)
0	1271165 ± 4090	5,184 ± 0,000	100,00
3	1239106 ± 9997	5,054 ± 0,043	97,48 ± 0,19
6	1227810 ± 7084	5,008 ± 0,047	96,60 ± 0,49
9	1212402 ± 12559	4,945 ± 0,043	95,39 ± 0,12
12	1202861 ± 7251	4,906 ± 0,099	94,64 ± 0,57
15	1198751 ± 10846	4,889 ± 0,007	94,31 ± 0,70
18	1162525 ± 3627	4,742 ± 0,002	91,47 ± 0,23
21	1104713 ± 11196	4,506 ± 0,001	86,93 ± 0,13
24	1089982 ± 10692	4,446 ± 0,005	85,77 ± 0,44
27	1032515 ± 10835	4,213 ± 0,000	81,26 ± 0,00
30	918448 ± 9571	3,748 ± 0,000	72,30 ± 0,00



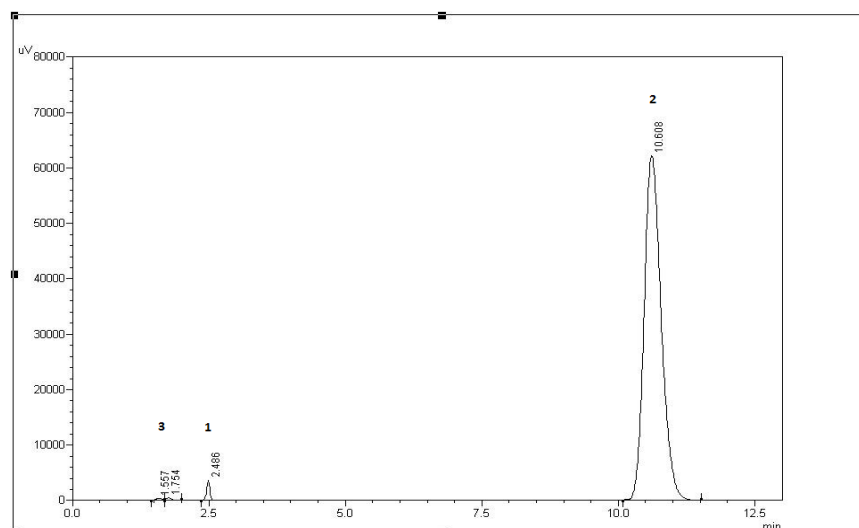
**Rycina 103. Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IP6 bezpośrednio po przygotowaniu na rozpuszczalniku poddanemu testowi przyspieszonego starzenia
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego**



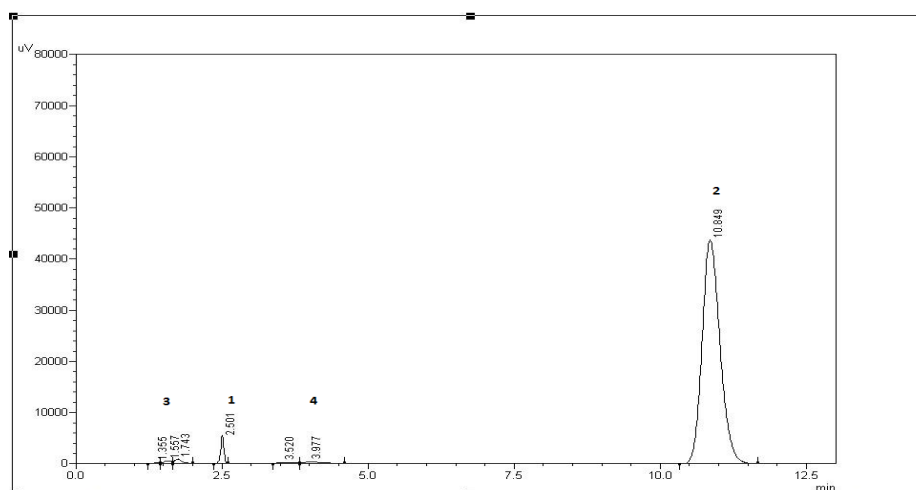
**Rycina 104. Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IP6 po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C
1-uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu**

Tabela 76. Wyniki badań zawartości cefepimu w 5% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (IIP6) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu rozpuszczalnika przemysłowego poddanego testowi przyspieszonego starzenia, wraz z oceną statystyczną

Wersja IIP6, średnia dla serii 1 i serii 2			
Dzień	Średnie pole powierzchni piku cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości + SD (%)
0	1322449 ± 3301	5,393 ± 0,003	100,00
3	1277845 ± 12458	5,211 ± 0,049	96,63 ± 0,22
6	1244784 ± 4732	5,077 ± 0,001	94,14 ± 0,02
9	1237572 ± 11412	5,047 ± 0,051	93,59 ± 0,26
12	1207959 ± 11175	4,927 ± 0,009	91,36 ± 0,02
15	1190620 ± 10888	4,856 ± 0,016	90,05 ± 0,06
18	1179596 ± 7916	4,811 ± 0,059	89,22 ± 0,25
21	1154814 ± 11531	4,710 ± 0,038	87,35 ± 0,15
24	1082764 ± 1747	4,417 ± 0,004	81,91 ± 0,01
27	1079489 ± 9899	4,404 ± 0,000	81,66 ± 0,01
30	963863 ± 3429	3,933 ± 0,454	72,93 ± 1,64



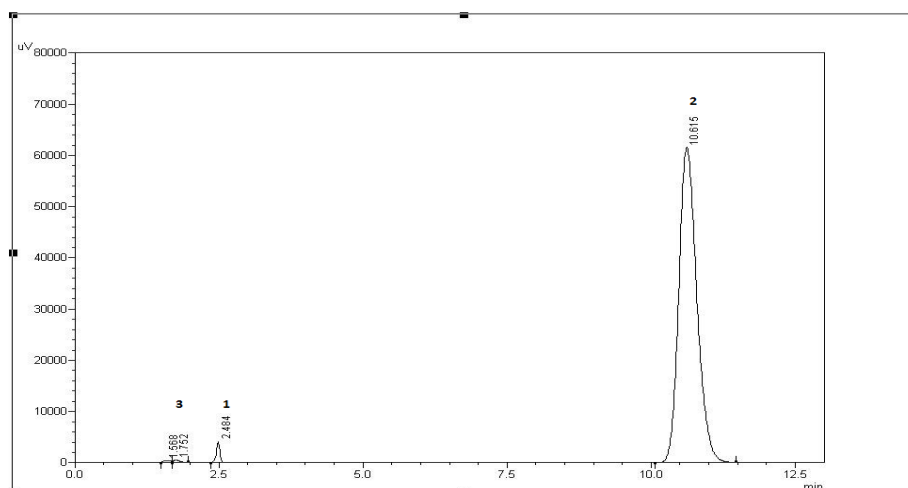
Rycina 105. Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IIP6 bezpośrednio po przygotowaniu na rozpuszczalniku poddanemu testowi przyspieszonego starzenia
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego



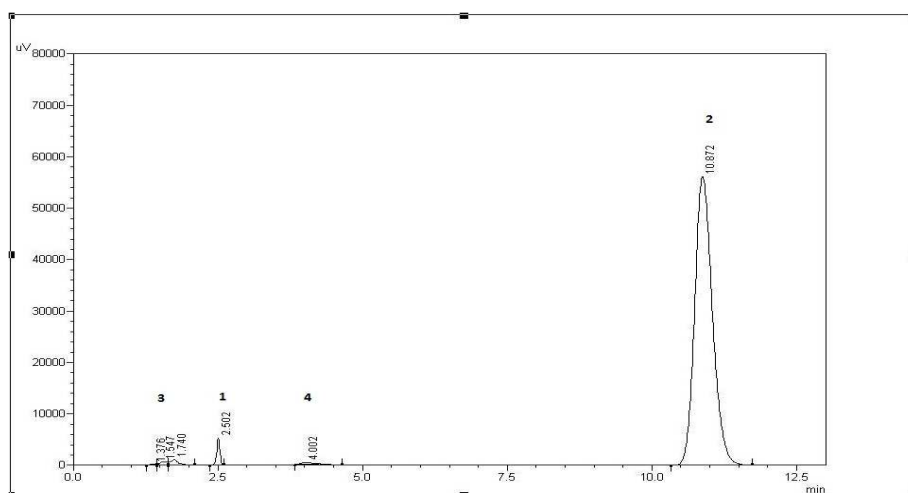
Rycina 106. Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IIP6 po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C.
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu

Tabela 77. Wyniki badań zawartości cefepimu w 5% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (IVP6) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu rozpuszczalnika przemysłowego poddanego testowi przyspieszonego starzenia, wraz z oceną statystyczną

Wersja IVP6, średnia dla serii 1 i serii 2			
Dzień	Średnie pole powierzchni piku cefepimu ± SD (n=6)	Średnie stężenie antybiotyku ± SD [g/100 ml]	Zmiana zawartości + SD (%)
0	1287869 ± 11601	5,252 ± 0,003	100,00
3	1263995 ± 11443	5,155 ± 0,006	98,15 ± 0,014
6	1262796 ± 10750,	5,150 ± 0,032	98,06 ± 0,145
9	1253030 ± 10484	5,110 ± 0,020	97,30 ± 0,111
12	1244991 ± 11459	5,078 ± 0,018	96,68 ± 0,100
15	1216761 ± 2211	4,963 ± 0,012	94,49 ± 0,043
18	1188111 ± 11268	4,846 ± 0,016	92,27 ± 0,088
21	1167072 ± 7017	4,760 ± 0,010	90,64 ± 0,032
24	1079489 ± 9249	4,404 ± 0,000	83,85 ± 0,012
27	1077123 ± 10357	4,394 ± 0,001	83,66 ± 0,017
30	1067600 ± 982	4,355 ± 0,004	82,93 ± 0,028



**Rycina 107. Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IVP6 bezpośrednio po przygotowaniu na rozpuszczalniku poddanemu testowi przyspieszonego starzenia
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego**



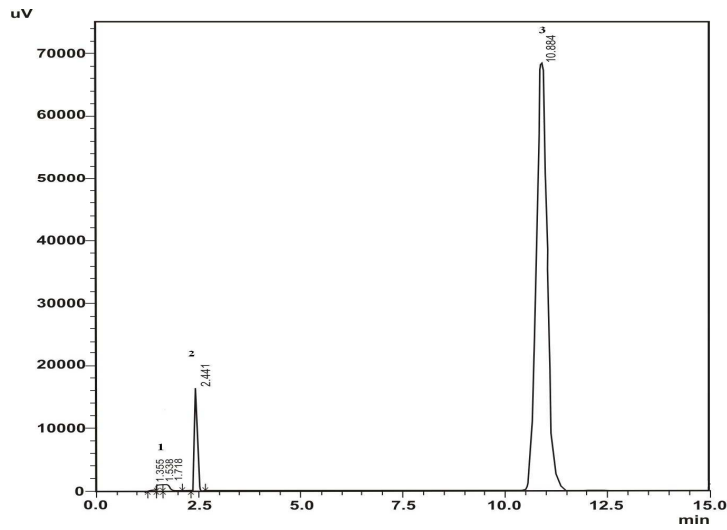
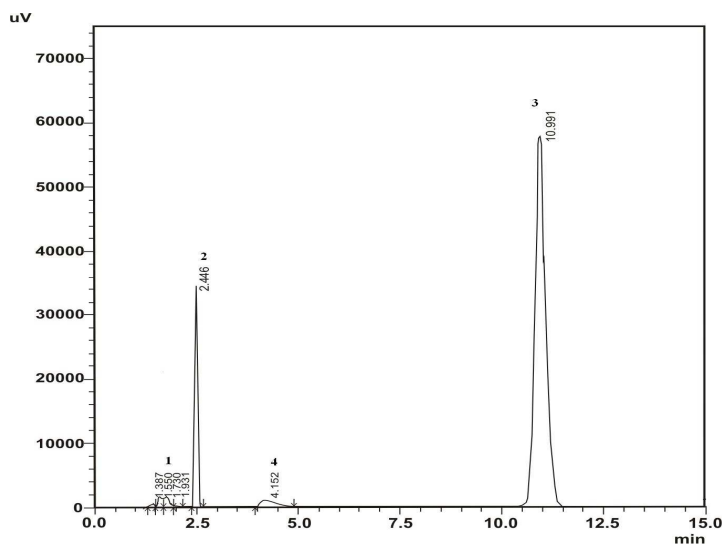
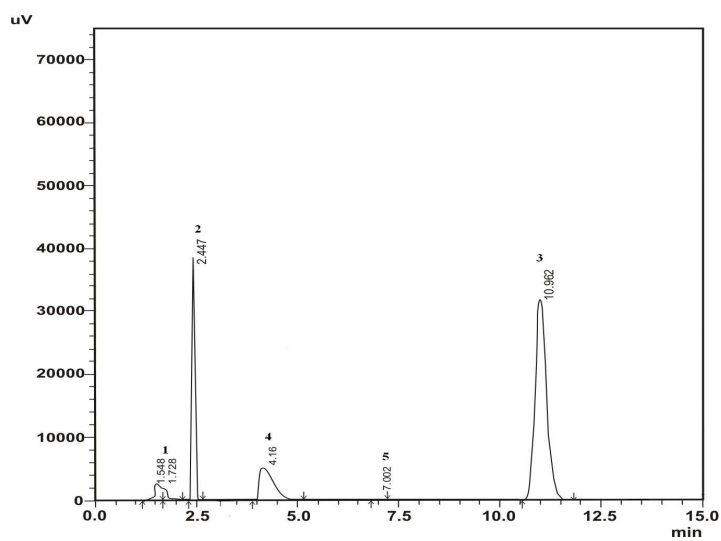
**Rycina 108. Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IVP6 po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C.
1- uracyl, 2- cefepim, 3- składniki buforu cytrynianowego, 4- produkt rozkładu cefepimu**

Tabela 78. Trwałość cefepimu w 1% i 5% kroplach „przemysłowych” przygotowanych przy zastosowaniu świeżo sporządzonych rozpuszczalników oraz rozpuszczalników poddanych procesowi przyspieszonego starzenia

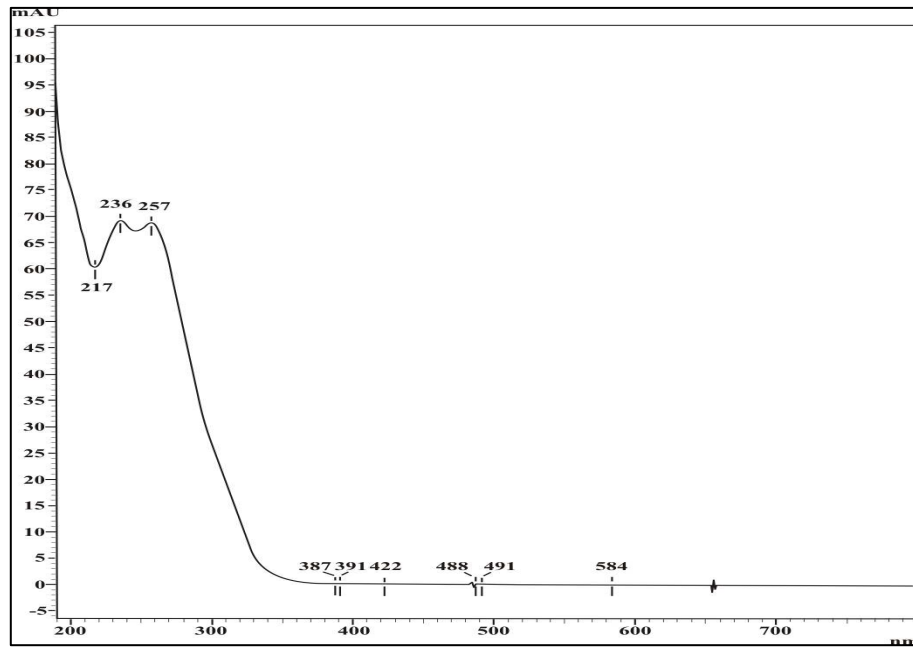
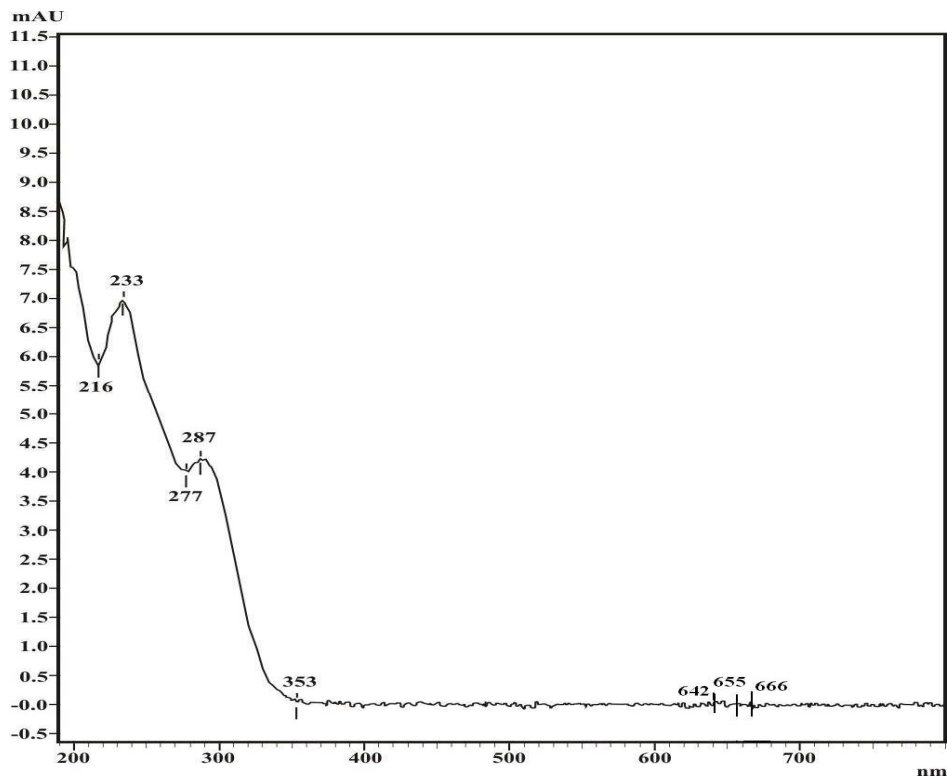
Wersje kropli do oczu z 1% i 5% cefepimem sporządzonych z zastosowaniem rozpuszczalników świeżo przygotowanych	Krople „przemysłowe” P0						
	1% krople „przemysłowe”				5% krople „przemysłowe”		
	1P0	2P0	3P0	4P0	IP0	IIIP0	IVP0
trwałość (4°C)	27 dni	21 dni	24 dni	21 dni	18 dni	15 dni	18 dni
Wersje kropli do oczu z 1% i 5% cefepimem sporządzonych z zastosowaniem rozpuszczalników poddanych testowi przyspieszonego starzenia	Krople „przemysłowe” P6						
	1% krople „przemysłowe				5% krople „przemysłowe		
	1P6	2P6	3P6	4P6	IP6	IIIP6	IVP6
trwałość (4°C)	24 dni	21 dni	24 dni	21 dni	18 dni	15 dni	21 dni

11. Produkt rozkładu cefepimu w 1% i 5% kroplach do oczu przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C

Przy pomocy oprogramowania LC Solution sterującego zestawem do chromatografii cieczowej wykonano widmo absorpcji w UV produktu rozpadu ($t_R=4,16$ min), pojawiającego się najszybciej w 1% i 5% kroplach recepturowych (Ryciny 26-70) i w kroplach „przemysłowych” (Ryciny 81-108) przechowywanych w temperaturze 20°C. Widmo absorpcji cefepimu w UV charakteryzuje się dwoma maksimumami przy długości fali $\lambda=236$ nm oraz 257 nm. W widmie absorpcji produktu rozkładu $t_R= 4,16$ min nastąpił zanik charakterystycznego dla cefepimu maksimum przy długości fali $\lambda=257$ nm oraz w tym widmie pojawiło się nowe maksimum przy długości fali $\lambda=287$ nm (Ryciny 109 i 110).

A**B****C**

**Rycina 109. Przykładowe chromatogramy 1% buforowanych kropli do oczu z cefepimem w wersji 1R po sporządzeniu (A), po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C (B) oraz po 30 dniach przechowywania w temp. 20°C (C)
1- składniki buforu cytrynianowego, 2- uracyl- marker, 3- cefepim, 4-5- produkty rozkładu cefepimu**

A**B**

Rycina 110. Widmo w UV-Vis cefepimu ($t_R=10,884$ min) zawartego w 1% kroplach świeżo sporządzonych wersji recepturowej 1R (A). Widmo absorpcji produktu rozpadu cefepimu ($t_R=4,16$ min) stwierdzonego w kroplach po 30 dniach przechowywania w temp. 20°C (B)

V. Omówienie wyników

W ramach zaplanowanego celu pracy realizowano następujące badania:

- Opracowanie technologii 1% i 5% (w/w) recepturowych kropli do oczu z cefepimem i określenie trwałości kropli przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C poprzez wyznaczenie czasu (dni), w którym stężenie cefepimu w kroplach będzie utrzymywało się na poziomie nie niższym jak 90% początkowego stężenia.
- Opracowanie i walidacja metody HPLC do ilościowego oznaczania cefepimu w 1% i 5% recepturowych i „przemysłowych” kroplach do oczu, świeżo sporządzonych oraz w czasie ich przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C
- Ocena wpływu niezbędnych w składzie kropli substancji pomocniczych (rozpuszczalników, substancji buforujących, substancji zwiększającej lepkość, substancji konserwujących), temperatury przechowywania oraz stężenia cefepimu na właściwości fizyczne oraz trwałość cefepimu w 1% i 5% kroplach recepturowych.
- Opracowanie składu i metody sporządzania rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% „przemysłowych” kropli z cefepimem z określeniem ich trwałości testem przyspieszonego starzenia i testem długoterminowym zgodnie z wytycznymi ICH oraz badaniami skuteczności przeciwdrobnoustrojowej środków konserwujących w rozpuszczalnikach z ich zawartością.
- Ocena trwałości cefepimu w 1% i 5% kroplach wersjach „przemysłowych”, sporządzonych z zastosowaniem rozpuszczalników świeżo sporządzonych oraz poddanych badaniom trwałości testem przyspieszonym według ICH.

W pierwszym etapie badań dokonano testu zgodności farmaceutycznej 1% i 5% wodnych roztworów cefepimu z substancjami pomocniczymi, które w założeniu pracy powinny być włączone do składu kropli. Wyniki analizy przedstawiono w tabeli 12. W interakcję farmaceutyczną z 1% i 5% roztworami cefepimu wchodziły środki konserwujące: chlorek benzalkoniowy, tiomersal, dioctan chlorheksydyny natomiast boran fenylortęciowy wykazywał inetrakcję wyłącznie z 5% roztworem antybiotyku (Tabela 12).

Do sporządzania kropli z cefepimem w wersjach recepturowych i rozpuszczalników cefepimu do wersji „przemysłowych” wykorzystano roztwory substancji pomocniczych, których tok sporządzania opisano w pkt. 4. W ramach oceny jakościowej buforów cytrynianowych przed procesem wyjaławiania oraz po nim dokonano pomiarów: pH, ciśnienia osmotycznego oraz przeprowadzono ocenę organoleptyczną (zabarwienie i przezroczystość), a w przypadku roztworu alkoholu poliwinylowego zmierzono dodatkowo lepkość. (Tabele 9 i 11).

Do określenia zmian zawartości cefepimu w badanych 1% i 5% kroplach oraz roztworach wodnych świeżo sporządzonych oraz w czasie ich przechowywania w temp. 4°C i 20°C zastosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz, którą walidowano pod kątem: specyficzności, dokładności, precyzji i liniowości oraz wyznaczono granicę wykrywalności i oznaczalności cefepimu w trakcie całego cyklu badań. Ponadto dokonano oceny wpływu niewielkich zaplanowanych zmian na parametry analizy chromatograficznej – robustness. Tożsamość cefepimu w badaniach trwałości roztworów i kropli została przedstawiona w pkt. 8.6.

- **Specyficzność**

W badaniu specyficzności (pkt. 8.7.1) wykazano, że środki pomocnicze zawarte w kroplach do oczu z cefepimem tj. cytrynian sodu, kwas cytrynowy, alkohol poliwinylowy, boran fenylortęciowy i alkohol β -fenyloetylowy nie miały wpływu na wynik oznaczeń cefepimu w kroplach, ponieważ przy długości fali 254 nm i przy czasie retencji, charakterystycznym dla cefepimu (t_R =ok.10,99 min) nie pojawiły się piki pochodzące od zastosowanych substancji pomocniczych (Rycina 21-23). Pik cefepimu nie interferował z pikiem produktu rozkładu, którego czas retencji był niższy (t_R = ok.4,18 min.) od czasu retencji cefepimu (Rycina 109 i 110).

- **Dokładność**

Za miarę dokładności przyjęto procent odzysku antybiotyku z mieszanin modelowych o określonej zawartości cefepimu (pkt. 8.7.2) Dokładność oznaczeń cefepimu w 1% kroplach wynosiła od 100,21% do 102%, natomiast w 5% kroplach od 98,11% do 104,52%.

- **Precyzja**

Precyzję (pkt. 8.7.3.) oznaczeń cefepimu w badanych kroplach określono podczas analizy mieszanin modelowych antybiotyku poprzez obliczenie procentowego względnego odchylenia standardowego, zwanego współczynnikiem zmienności (Wz).

- **Liniowość**

W opracowanej metodzie ilościowego oznaczania cefepimu w kroplach i roztworach wodnych wyznaczono cztery krzywe wzorcowe, w zakresie stężeń cefepimu od około 12,60 $\mu\text{g/ml}$ do około 125,20 $\mu\text{g/ml}$, czyli w zakresie od 12,6% do 125% oczekiwanych wyników analizy kropli i roztworów wodnych w dniu ich sporządzenia (pkt. 8.4). Przeprowadzona analiza regresji potwierdziła istotność korelacji między oznaczonym polem powierzchni, a stężeniem wzorca cefepimu w analizowanych próbach (pkt. 8.7.4.).

- **Granica wykrywalności (DL) i granica oznaczalności (QL)**

Zarówno granicę wykrywalności i oznaczalności określono na podstawie wartości współczynnika kierunkowego krzywej kalibracyjnej (a) oraz odchylenia standardowego (S_y) (pkt. 8.7.5.).

Granice wykrywalności wyznaczono ze wzoru:

$$DL = 3,3 \cdot \frac{S_y}{a}$$

natomiast granicę oznaczalności obliczono ze wzoru:

$$QL = 10 \cdot \frac{S_y}{a}$$

Wyniki oznaczeń wykrywalności i oznaczalności przedstawiono w pkt. 8.7.5. i 8.7.6.

- **Robustness (elastyczność metody HPLC)**

Wpływ niewielkich zaplanowanych zmian w opracowanej metodzie HPLC na dokładność i precyzję oznaczania zawartości cefepimu w analizowanej próbce zbadano poprzez modyfikację temperatury kolumny chromatograficznej oraz zmianę stężenia acetonitrylu w fazie ruchomej. Zbadano zawartość antybiotyku w próbce w trzech różnych temperaturach kolumny oraz w trzech różnych wariantach zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej. Wydłużenie czasu retencji dla piku cefepimu występowało w przypadku niższej zawartości acetonitrylu. Żadna z zastosowanych modyfikacji temperaturowych i składu eluenta nie miała wpływu na oznaczanie zawartości cefepimu w badanej próbce. Ponadto zmiany parametrów analizy nie wpłynęły negatywnie na parametry procesu chromatograficznego, wymagane przez USP 32 w monografiach: *Cefepime hydrochloride* i *Cefepime for Injection*.

Współczynnik ogonowania dla cefepimu w badaniach elastyczności zawarty był w granicach od 1,08 do 1,17 (T_F dla cefepimu nie może przekraczać 1,7), natomiast uzyskana w badaniach elastyczności liczba pól teoretycznych na metr wynosiła od 31071,2 do 56117,7 (wartość N powinna być nie mniejsza od 1500) (pkt. 8.7.7, Tabela 36).

Parametry rozdziału chromatograficznego w analizie stężenia cefepimu w roztworach wodnych i kroplach do oczu.

W trakcie oznaczeń zawartości cefepimu w badanym materiale, oprócz pól powierzchni cefepimu wyznaczono szereg parametrów chromatograficznych, których wartości świadczyły o sprawności kolumny oraz stałych warunkach rozdziałów. W czasie całego cyklu badań współczynnik retencji dla cefepimu wyniósł średnio $k=3,45$, natomiast rozdzielczość R_s pików cefepimu w stosunku do innych pików wyniosła powyżej 1,5. Uzyskano liczbę pól teoretycznych N powyżej 1500, czyli nie mniej niż 6000 pól na metr w przypadku kolumny Gemini zastosowanej w badaniach (pkt 8.8.2). Współczynnik ogonowania T_F dla pików cefepimu wynosił nie więcej niż 1,7 (Tabela 37). Chromatogramy oraz parametry rozdziału chromatograficznego cefepimu w 1% i 5% kroplach w wersjach recepturowych i „przemysłowych”, w dniu sporządzania i w 30 dniu przechowywania przedstawiono na rycinach 26-70 i 81-108 oraz w tabelach 38-52 i 64-77.

1% i 5% krople recepturowe z cefepimem

1% krople z cefepimem w wersjach recepturowych zaprojektowano w sześciu wariantach, natomiast 5% krople badano w 7 wersjach recepturowych (Tabela 13). W celach porównawczych sporządzono 1% i 5% roztwory wodne cefepimu, które stanowiły punkty odniesienia w badaniach wpływu substancji pomocniczych, włączonych do składu kropli, na trwałość antybiotyku w kroplach oraz na ich właściwości fizyczne. Każda zaproponowana wersja recepturowa kropli 1% i 5% mogłaby być zastosowana (z wyjątkiem kropli 5% z 12 - dniową trwałością) w określonych przypadkach okulistycznych infekcji bakteryjnych, w których powinny być brane pod uwagę takie czynniki jak: stan zakażenia, jego intensywność, obszar oka objęty zakażeniem oraz etap zakażenia.

Krople 1% i 5% sporządzone według składu recepturowego formułacji nr 1R i nr IR mogą być przeznaczone do stosowania szczególnie w początkowym, ostrym etapie zakażenia, w którym jest wskazane stosowanie kropli zawierających środki konserwujące i zwiększające lepkość. Krople 1% i 5% formułacji nr 1R i nr IR wskazane są również w leczeniu pacjentów z uszkodzonym nabłonkiem rogówki lub brakiem tolerancji oka na środki konserwujące. Krople 1% zawierające środki konserwujące (formulacja nr 2R) są zalecane po opanowaniu ostrej fazy zakażenia, przy braku objawów uszkodzenia nabłonka rogówki oraz w przypadku dobrej tolerancji oka pacjenta na środki konserwujące. Zastosowanie kropli 1% i 5% z cefepimem

zawierających poliwinylalkohol zwiększający lepkość kropli oraz wydłużający czas kontaktu kropli z okiem (formulacja 3R) będzie korzystne w przypadku konieczności penetracji cefepimu przez rogówkę do przedniej komory oka. Krople 1% formulacji 4R, zawierające środki konserwujące i poliwinylalkohol mogą być zastosowane po opanowaniu ostrej fazy zakażenia przy braku objawów uszkodzenia rogówki oraz w przypadku dobrej tolerancji oka na środki konserwujące.

Zaproponowane formulacje sporządzono w warunkach aseptycznych, zgodnie z metodyką przytoczoną w pkt. 6.3 - 6.7. Każda z wersji kropli zastała wykonana w dwóch przechowywanych i analizowanych niezależnie seriach (seria 1 i seria 2). Krople przechowywane były w chłodziarkach farmaceutycznych w temperaturze 4°C i 20°C przez 30 dni. Podczas przechowywania w określonych odstępach czasu dokonywano oceny fizykochemicznej kropli, która obejmowała badania: pH, ciśnienia osmotycznego, zabarwienia, przezroczystości oraz analizę zawartości cefepimu w kroplach metodą HPLC. W wersjach kropli zawierających alkohol poliwinylowy zbadano również lepkość.

pH 1% i 5% kropli recepturowych

pH świeżo sporządzonych buforowanych 1% kropli wyniosło 5,92-6,21, pH 1% niebuforowanych roztworów wodnych $O_{(1\%)}$ wyniosło 4,78. Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C pH 1% kropli nie uległo istotnym zmianom i zawarte było w granicach pH = 6,14-6,33.

pH 1% niebuforowanych roztworów wodnych $O_{(1\%)}$ po 30 dniach przechowywania w obu temperaturach wyraźnie wzrosło z pH 4,78 do pH 6,37 (temp. 4°C) oraz z pH 4,78 do pH 7,72 (temp. 20°C) (Tabela 16, Ryciny 8-9.).

pH świeżo sporządzonych buforowanych 5% kropli zawarte było w granicach 5,69-6,02, pH 5% niebuforowanych roztworów wodnych $O_{(5\%)}$ wykazywało wartość 4,83. Po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C pH kropli nie uległo istotnym zmianom i zawarte było w granicach 5,81-6,25. pH 5% kropli po 30 dniach przechowywania w temp. 20°C wzrosło z pH 5,69-6,02 do pH 6,79-7,16.

Wzrost pH niebuforowanych 5% roztworów wodnych $O_{(5\%)}$ po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C i 20°C był istotny: z pH 4,83 do pH 6,76 (temp. 4 °C) oraz z pH 4,83 do pH 8,21 (temp. 20°C) (Tabela 16, Ryciny 10-11.).

Ciśnienie osmotyczne 1% i 5% kropli recepturowych

Ciśnienie osmotyczne świeżo sporządzonych buforowanych 1% kropli zawarte było w granicach: 374-467 mOsm/l. Po 30 dniach przechowywania w obu temperaturach ciśnienie osmotyczne 1% kropli nie uległo istotnym zmianom i wyniosło od 377 mOsm/l do 480 mOsm/l (temp. 4 °C) i od 391 do 489 mOsm/l (temp. 20°C). Ciśnienie osmotyczne 1% niebuforowanych wodnych roztworów $O_{(1\%)}$ wyniosło 93 mOsm/l, po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C ciśnienie osmotyczne wzrosło: do 97 mOsm/l (temp. 4 °C) oraz do 108 mOsm/l (temp. 20°C) (Tabela 17, 83, Ryciny 12-13).

Ciśnienie osmotyczne świeżo sporządzonych buforowanych 5% kropli zawarte było w granicach: 553-728 mOsm/l. Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C wartości ciśnienia osmotycznego kropli nie różniły się w sposób istotny od wartości ciśnienia osmotycznego w kroplach świeżo sporządzonych i wyniosły: od 525-724 mOsm/l (temp. 4°C) oraz od 563 do 747 mOsm/l (temp. 20°C). Ciśnienie osmotyczne w 5% wodnych niebuforowanych roztworach $O_{(5\%)}$ wyniosło 391 mOsm/l, po 30 dniach przechowywania w 4°C nieznacznie się obniżyło do wartości 385 mOsm/l, natomiast po 30 dniach przechowywania w temp. 20°C wzrosło do 428 mOsm/l. (Tabela 17, 83, Ryciny 14-15).

Lepkość 1% i 5% kropli recepturowych

Do zwiększenia lepkości kropli recepturowych zastosowano roztwory pomocnicze alkoholu poliwinylowego o lepkości 17,21 mPa·s oraz o lepkości 43,21 mPa·s. Stężenie alkoholu poliwinylowego w kroplach wynosiło: od 1,77% w kroplach IVR do 2,95% w kroplach 3aR (Tabela 13.). Lepkość 1% kropli świeżo sporządzonych zawarta była w granicach od 4,93 do 9,16 mPa·s, lepkość 5% kropli świeżo sporządzonych była zbliżona do lepkości kropli 1% i wyniosła: od 4,95 do 9,13 mPa·s. Po 30 dniach przechowywania w obu temperaturach lepkość kropli 1% i 5% nie uległa istotnym zmianom i była zbliżona do wartości początkowych (Tabela 18).

Analiza organoleptyczna 1% i 5% kropli recepturowych

Świeżo sporządzone 1% i 5% wodne roztwory cefepimu oraz 1% i 5% krople były bezbarwne (1%) lub lekko żółte (5%). W dniu utraty trwałości 1% buforowane krople do oczu przechowywane w temp. 4°C w zależności od wersji z bezbarwnych przybrały kolor słomkowy albo żółty, natomiast 5% krople przybrały barwę cytrynową do żółtej. We wszystkich wersjach 1% i 5% kropli buforowanych w dniu utraty trwałości wyczuwalny był zapach produktów rozkładu.

Niebuforowane 1% i 5% roztwory wodne cefepimu: $O_{(1\%)}$ i $O_{(5\%)}$ w czasie przechowywania w temp. 4°C w dniu utraty trwałości przybrały barwę żółtą (1%) lub ciemnożółtą (5%), czemu również towarzyszył nieprzyjemny zapach produktów rozpadu.

Niebuforowane roztwory wodne cefepimu w stężeniu 1% i 5% przechowywane w temperaturze 20°C wraz z utratą trwałości w trzecim dniu przechowywania przybrały kolor bursztynowy (1%) lub pomarańczowy (5%). Zmianom zabarwienia towarzyszył nieprzyjemny zapach produktów rozkładu. W stosunku do kropli buforowanych zmiany dotyczące barwy i zapachu zawsze szybciej pojawiły się w roztworach wodnych niż w kroplach buforowanych, a intensywność tych zmian zależna była od stężenia roztworów i temperatury przechowywania (największe zmiany dotyczyły 5% roztworów wodnych przechowywanych w temperaturze 20°C). Buforowanie 1% i 5% kropli poskutkowało opóźnieniem pojawienia się niekorzystnych zmian organoleptycznych (zabarwienie, zapach) w kroplach przechowywanych w obu warunkach temperaturowych.

Trwałość cefepimu w 1% i 5% recepturowych kroplach do oczu

- Wpływ temperatury przechowywania na trwałość cefepimu w 1% i 5% roztworach wodnych oraz 1% i 5% kroplach wersjach recepturowych

Głównym czynnikiem decydującym o trwałości 1% i 5% cefepimu w kroplach okazała się temperatura przechowywania kropli, co zaobserwowano na podstawie porównania trwałości cefepimu w 1% i 5% kroplach przechowywanych w temperaturze 4°C z trwałością cefepimu w 1% i 5% kroplach przechowywanych w temperaturze 20°C. Trwałość cefepimu w 1% kroplach przechowywanych w temperaturze 4°C w zależności od składu wersji recepturowej wyniosła od 21 dni (wersja nr 3aR i 4aR) i 24 dni (wersja 3R) do 27 dni (wersje 1R, 2R, 4R) (Tabele 39-44).

Trwałość 5% kropli przechowywanych w temperaturze 4°C w zależności od składu wersji recepturowej wynosiła 12 dni (wersje recepturowe nr IIIIR, IVR, IVbR) i 18 dni (wersje nr 1R, IaR) do 21 dni (wersje nr IIIaR, IVaR) (Tabele 39, 47, 49, 51).

1% i 5% krople przechowywane w temperaturze 20°C charakteryzowały się trwałością wynoszącą zaledwie 3 dni (wersje recepturowe nr 1R, 2R, 3aR, IR, IaR, IIIIR, IVR, IVaR, IVbR) do najwyżej 6 dni (wersje nr 3R, 4R, 4aR, IIIaR) (Tabele 39-44, 46-52, 79, 84).

Trwałość roztworów wodnych przechowywanych w temperaturze 4°C wyniosła 24 dni dla roztworów 1% ($O_{(1\%)}$) oraz 18 dni dla roztworów 5% ($O_{(5\%)}$). W temperaturze 20°C w obu stężeniach trwałość cefepimu wyniosła 3 dni (Tabele 38, 45, 79).

1% i 5% krople do oczu z cefepimem powinny być chronione przed światłem, przechowywane w temperaturze 4°C.

Tabela 79. Porównanie trwałości 1% i 5% roztworów wodnych oraz 1% i 5% recepturowych kropli do oczu z cefepimem przechowywanych w temperaturze 4°C i 20°C przez 30 dni.

Temperatura przechowywania	Wersje recepturowe 1%							
	$O_{(1\%)}$	1R	2R	3R	3aR	4R	4aR	
4°C	24 dni	27 dni	27 dni	24 dni	21 dni	27 dni	21 dni	
20°C	3 dni	3 dni	3 dni	6 dni	3 dni	6 dni	6 dni	
Temperatura przechowywania	Wersje recepturowe 5%							
	$O_{(5\%)}$	IR	IaR	IIIR	IIIaR	IVR	IVaR	IVbR
4°C	18 dni	18 dni	18 dni	12 dni	21 dni	12 dni	21 dni	12 dni
20°C	3 dni	3 dni	3 dni	3 dni	6 dni	3 dni	3 dni	3 dni

- Wpływ stężenia na trwałość cefepimu

Trwałość cefepimu w 1% i 5% kroplach oraz w 1% i 5% wodnych roztworach cefepimu przechowywanych w temperaturze 4°C uzależniona była od jego stężenia. Trwałość cefepimu w 1% kroplach i 1% wodnych roztworach cefepimu była znacznie wyższa w porównaniu z trwałością analogicznych wersji roztworów i kropli o stężeniu 5%. W 1% kroplach trwałość cefepimu wyniosła od 21 dni (wersja recepturowa nr 3aR i 4aR) i 24 dni (wersja recepturowa nr 3R) do 27 dni (wersje nr 1R, 2R, 4R) (tabele 39-44, 79, 84).

W 5% kroplach trwałość cefepimu wyniosła od 12 dni (wersje recepturowe nr IIIR, IVR, IVbR) i 18 dni (wersje nr IR, IaR) do 21 dni (wersje nr IIIaR, IVaR) (Tabele 46-52, 79, 84). Roztwory wodne cefepimu w stężeniu 1% ($O_{(1\%)}$) przechowywane w temp. 4°C były trwałe przez 24 dni, dla porównania roztwory wodne cefepimu w stężeniu 5% ($O_{(5\%)}$) były trwałe 18 dni (Tabela 38, 45, 79).

W przypadku przechowywania roztworów i kropli w temperaturze 20°C, bez względu na stężenie, trwałość cefepimu była bardzo niska: w 1% kroplach i w 1% wodnych roztworach cefepimu oraz w 5% kroplach i w 5% wodnych roztworach cefepimu trwałość antybiotyku była zbliżona i wynosiła od 3 do 6 dni (Tabela 38, 45, 79).

- Wpływ substancji pomocniczych na trwałość cefepimu

Bufory cytrynianowe

Do buforowania 1% i 5% kropli z cefepimem w wersjach recepturowych zastosowano trzy układy buforowe (Tabela 9):

bufor I : pH 6,20; ciśnienie osmotyczne 298 mOsm/l

bufor II: pH 6,05; ciśnienie osmotyczne 586 mOsm/l

bufor III: pH 6,20; ciśnienie osmotyczne 167 mOsm/l (Tabela 9).

Bufor cytrynianowy I (298 mOsm/l) zwiększał trwałość cefepimu w 1% kroplach recepturowych. Zaobserwowano to porównując wyniki trwałości cefepimu w 1% niebuforowanych roztworach wodnych ($O_{(1\%)}$) wynoszącej 24 dni z trwałością 1% buforowanych kropli wersji 1R, w której trwałość cefepimu wyniosła 27 dni (Tabele 38-39, 79, 84).

Bufor cytrynianowy II (586 mOsm/l) obniżał trwałość cefepimu w 1% kroplach recepturowych, w porównaniu z jego trwałością w kroplach, w których został zastosowany bufor cytrynianowy nr I (wersja nr 1R - trwałość 27 dni). Zaobserwowano to również porównując trwałość cefepimu w 1% kroplach recepturowych zawierających bufor II (wersja kropli 3R trwałość : 24 dni oraz wersja 3aR trwałość: 21 dni). Ponieważ w skład kropli 3R i 3aR oprócz buforu cytrynianowego II wchodził alkohol poliwinylowy (PVA) w stężeniu 1,98% w wersji 3R oraz w stężeniu 2,95% w wersji 3aR, nie można było jednoznacznie stwierdzić w jakim stopniu obniżał trwałość sam bufor II.

W tym przypadku mógł nałożyć się negatywny wpływ obu składników, tj. buforu cytrynianowego II i PVA na trwałość cefepimu w kroplach nr 3R i 3aR (Tabele 39, 41-42). Negatywny wpływ buforu cytrynianowego II na trwałość cefepimu zaznaczył się również w 5% kroplach recepturowych. Zaobserwowano to porównując trwałość cefepimu w 5% niebuforowanych roztworach wodnych ($O_{(5\%)}$), która wyniosła 18 dni z kroplami wersji IIIIR, zbuforowanymi buforem II (ciśn.osmot. 586 mOsm/l), gdzie trwałość cefepimu obniżyła się

do 12 dni. Ponadto 5% krople buforowane buforem II wykazywały ciśnienie osmotyczne mniej korzystne dla oka, z powodu różnicy między ciśnieniem osmotycznym płynu łzowego (280-300mOsm/l), a ciśnieniem osmotycznym 5% kropli wynoszącym od 636 mOsm/l (wersja kropli nr IVbR) do 728 mOsm/l (wersja kropli nr IVR) (Tabela 17).

Z przeprowadzonych badań wynika, że 5% krople z cefepimem nie powinny być buforowane buforem II, lecz buforem I lub III. Krople 1% zbuforowane buforem I charakteryzowały się ciśnieniem osmotycznym optymalnym dla oka, wynoszącym: 374 mOsm/l (wersja nr 1R) i 398 mOsm/l (wersja nr 2R) oraz trwałością cefepimu dłuższą niż w przypadku kropli buforowanych buforem II (Tabela 17, 79, 84).

- Wpływ PVA na trwałość cefepimu w kroplach

Alkohol poliwinylowy został zastosowany w 1% kroplach o zwiększonej lepkości w stężeniach 1,91% (wersja recepturowa nr 4R), 1,98% (wersja nr 3R), 2,86% (wersja 4aR) i 2,95% (wersja nr 3aR). Do kropli z 5% zawartością cefepimu PVA zastosowano w stężeniach: 1,77% (wersja nr IVR i IVaR), 1,83% (wersja IIIR i IIIaR) oraz 2,65% (wersja IVbR) (Tabela 13).

Zaobserwowano, że PVA obniżał trwałość cefepimu w kroplach 1% jeśli jego stężenie było wyższe jak 2%. Obrazują to wyniki trwałości kropli wersji 3R i 4R z zawartością PVA wynoszącą odpowiednio 1,98 % i 1,91% i z trwałością antybiotyku wynoszącą 24 dni dla wersji 3R i 27 dni dla wersji 4R.

Trwałość kropli wersji: 3aR i kropli wersji 4aR z zawartością PVA wynoszącą odpowiednio 2,86% i 2,95% uległa obniżeniu do 21 dni (Tabela 42, 44, 79).

Jeszcze wyraźniej negatywny wpływ PVA na trwałość cefepimu zaznaczył się w kroplach 5%. Trwałość wersji nr IVaR i nr IIIaR, w których stężenie PVA posiadało odpowiednio wartości 1,77% i 1,83%, wyniosła 21 dni. Zastosowanie PVA w stężeniu 2,65% (wersja IVbR) spowodowało obniżenie trwałości kropli do 12 dni (Tabela 49, 51, 52, 79).

- Wpływ środków konserwujących na trwałość cefepimu

Jedynym środkiem konserwującym, który mógłby być zastosowany w 1% kroplach z cefepimem jest boran fenylortęciowy. W teście zgodności farmaceutycznej (Tabela 12), w odróżnieniu od innych przebadanych środków konserwujących, boran fenylortęciowy był zgodny w 1% kroplach w stężeniu zwykle w tym celu stosowanym

tj. stężeniu 0,001%. Boran fenylortęciowy w kroplach zastosowany w skojarzeniu z alkoholem β -fenyloetylowym w stężeniu 0,4%, nie obniżał trwałości cefepimu. Zaobserwowano to na podstawie porównania wyników trwałości cefepimu w kroplach wersji 2R, w których trwałość antybiotyku wynosiła 27 dni, czyli tyle samo ile wynosiła trwałość cefepimu bez konserwantów (wersja 1R) (Tabela 39-40, 79, 84).

Boran fenylortęciowy w stężeniu 0,001% w kroplach był niezgodny z cefepimem w kroplach 5%. Cefepim w kroplach 5% wchodził w interakcję farmaceutyczną z boranem fenylortęciowym, co powodowało utratę przezroczystości i pojawienie się osadu.

Interakcji boranu fenylortęciowego w 5% kroplach z cefepimem udało się zapobiec wprowadzając do składu kropli PVA w stężeniu około 2% (wersje recepturowe IIIIR, IIIaR, IVR, IVaR) – Tabela 13. Boran fenylortęciowy zastosowany z alkoholem β -fenyloetylowym w 5% kroplach oraz z PVA nie obniżał trwałości cefepimu, obrazują to wyniki trwałości wersji IVaR (21 dni) (Tabela 51, 79).

1% i 5% krople „przemysłowe” z cefepimem

Rozpuszczalniki do 1% i 5% „przemysłowych” kropli z cefepimem

Na podstawie wyników badań trwałości cefepimu w 1% i 5% kroplach recepturowych oraz w oparciu o wyniki analiz fizycznych (pH, ciśnienie osmotyczne, lepkość) zaprojektowano skład rozpuszczalników do kropli „przemysłowych” (Tabela 53).

Z uwagi na ograniczoną trwałość cefepimu w roztworach wodnych koncepcja technologii kropli „przemysłowych” uwzględnia konieczność zastosowania opakowania o konstrukcji dwuzbiornikowej (dwukomorowej), w której sucha, jałowa postać cefepimu byłaby oddzielona od rozpuszczalnika. Połączenie cefepimu z rozpuszczalnikiem dokonywane byłoby w aptece w warunkach aseptycznych bezpośrednio przed wydaniem leku pacjentowi. Skład i sposób sporządzania rozpuszczalników przytoczono w pkt. 9.1 i 9.2.

Ocena fizykochemiczna rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych”

Ocena fizykochemiczna rozpuszczalników świeżo sporządzonych oraz poddanych testowi przyspieszonego starzenia i testowi długoterminowemu została przeprowadzona zgodnie z wymaganiami ICH Q1A (R2) [133]. Test przyspieszonego starzenia prowadzony był przez

okres 6 miesięcy w temp. $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ i RH $75\%\pm 5\%\text{RH}$. Test długoterminowy obejmował badania w okresie 12 miesięcy, zgodnie z następującymi warunkami przechowywania: temp. $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, RH $60\%\pm 5\%\text{RH}$. Test przyspieszonego starzenia umożliwił przewidzenie zmian fizycznych, które mogłyby zachodzić w rozpuszczalnikach podczas ich transportu w temperaturze 40°C . Badania trwałości rozpuszczalników testem długoterminowym prowadzone były w celu zdefiniowania warunków przechowywania rozpuszczalnika.

- Analiza organoleptyczna rozpuszczalników

Rozpuszczalniki „przemysłowe” świeżo sporządzone oraz poddane testowi przyspieszonego i długoterminowego starzenia pozostały bezbarwne i przezroczyste. Rozpuszczalniki z zawartością alkoholu β -fenyloetylowego wykazywały charakterystyczny zapach tego składnika (pkt. 9.3., Tabele 54-56).

- pH rozpuszczalników „przemysłowych”

pH rozpuszczalników świeżo sporządzonych oraz poddanych obu testom uległo nieznacznym zmianom, polegającym głównie na obniżeniu wartości pH. Wyniki badań pH dotyczące poszczególnych rozpuszczalników przedstawiono w tabelach 54-56 oraz na rycinach 71 i 74. Wyniki badań pH rozpuszczalników „przemysłowych” po 6 miesiącach przechowywania w warunkach testu przyspieszonego starzenia oraz po 12 miesiącach w warunkach testu długoterminowego zostały zestawione w tabeli 80.

Tabela 80. Zmiany pH rozpuszczalników „przemysłowych” w czasie badań stabilności.

Numer rozpuszczalnika „przemysłowego”	pH rozpuszczalników		
	Rozpuszczalnik świeżo sporządzony (dzień 0)	Po 6 m-cach, w temp. $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i RH $75\% \pm 5\%\text{RH}$	Po 12 m-cach, w temp. $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i RH $60\% \pm 5\%\text{RH}$
1	6,21 \pm 0,01	6,09 \pm 0,00	6,14 \pm 0,02
2	6,26 \pm 0,02	6,12 \pm 0,00	6,21 \pm 0,01
3	6,13 \pm 0,01	5,87 \pm 0,02	5,95 \pm 0,01
4	6,17 \pm 0,00	5,88 \pm 0,02	5,99 \pm 0,01
I	6,38 \pm 0,00	6,28 \pm 0,00	6,27 \pm 0,01
III	6,10 \pm 0,00	6,05 \pm 0,01	5,99 \pm 0,01
IV	6,20 \pm 0,01	6,01 \pm 0,00	6,01 \pm 0,01

- Cięnienie osmotyczne rozpuszczalników „przemysłowych”

W czasie badań stabilności rozpuszczalników przemysłowych zaobserwowano niewielkie zmiany ciśnienia osmotycznego. Zarówno podczas testu przyspieszonego starzenia jak i podczas badań długoterminowych zaobserwowano tendencję do nieznacznego wzrostu ciśnienia osmotycznego badanych rozpuszczalników, z wyjątkiem wersji IV przeznaczonej do 5% kropli przemysłowych, gdzie odnotowano niewielkie obniżenie ciśnienia osmotycznego. Większe zmiany wartości ciśnienia osmotycznego zaobserwowano w czasie testu przyspieszonego starzenia. Zakres tych zmian przedstawiono w tabeli 81. Zestawienie wartości ciśnienia osmotycznego rozpuszczalników sporządzono na podstawie tabeli 54-56 oraz ryciny 72 i 75.

Tabela 81. Zmiany ciśnienia osmotycznego rozpuszczalników „przemysłowych” w czasie badań stabilności.

Numer rozpuszczalnika „przemysłowego”	Ciężnienie osmotyczne [mOsm/l]		
	Rozpuszczalnik świeżo sporządzony (dzień 0)	Po 6 m-cach, w temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH	Po 12 m-cach, w temp. 25°C ± 2°C i RH 60% ± 5% RH
1	300±4	306±2	311±2
2	337±4	337±2	339±1
3	343±4	363±2	353±1
4	367±2	419±1	380±1
I	159±1	162±0	161±2
III	181±0	199±1	184±3
IV	240±3	234±2	230±1

- Lepkość rozpuszczalników „przemysłowych”

W przypadku rozpuszczalników „przemysłowych” zawierających alkohol poliwinylowy dodatkowo oznaczono lepkość. Lepkość rozpuszczalników podczas badań stabilności wykazywała nieznaczną tendencję do wzrostu, zwłaszcza dla rozpuszczalników do 1% kropli. W rozpuszczalnikach do 1% kropli stwierdzono mniejszą stabilność wartości lepkości, czego przyczyną może być oddziaływanie buforu cytrynianowego z alkoholem poliwinylowym. W wersjach rozpuszczalników nr III i IV dla 5% kropli „przemysłowych” zmiany lepkości były

mniejsze, ponieważ zastosowano w nich bufor cytrynianowy o niższym stężeniu składników, a także mniej stężony roztwór alkoholu poliwinylowego. Szczegółowy zakres tych zmian przedstawiono w tabelach 54-56 oraz na rycinach 73 i 76. Zestawienie wartości lepkości rozpuszczalników w badaniach stabilności sporządzono w tabeli 82.

Tabela 82. Zmiany lepkości rozpuszczalników „przemysłowych” w czasie badań stabilności

Numer rozpuszczalnika „przemysłowego”	Lepkość [mPa·s]		
	Rozpuszczalnik świeżo sporządzony (dzień 0)	Po 6 m-cach, w temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH	Po 12 m-cach, w temp. 25°C ± 2°C i RH 60% ± 5% RH
3	7,88±0,00	8,68±0,00	8,79±0,02
4	7,47±0,00	8,46±0,01	8,53±0,01
III	4,70±0,00	4,97±0,00	4,91±0,02
IV	4,55±0,00	4,96±2,00	4,91±2,00

- Badanie skuteczności przeciwdrobnoustrojowej środków konserwujących w rozpuszczalnikach „przemysłowych”

Przeprowadzono test skuteczności przeciwdrobnoustrojowej środków konserwujących w rozpuszczalnikach: nr 2 oraz nr 4 i nr IV po 12 miesiącach ich przechowywania w temperaturze 25°C ± 2° C / 60 % RH ± 5% RH. Wyniki testu konserwacji przedstawiono w tabeli 58.

Przeprowadzono dodatkowe badania skuteczności zastosowanych środków konserwujących wobec szczepu *Listeria monocytogenes*, nieujętego w monografii testu konserwacji Farmakopei Polskiej VII. Badania wykazały znaczną skuteczność przeciwdrobnoustrojową boranu fenylortęciowego i alkoholu β – feniloetylowego wobec tego szczepu (Tabela 58).

W przypadku szczepu *Bacillus cereus*, nie objętego farmakopealnym testem konserwacji, redukcja komórek w 28 dniu badań wyniosła 99,99%, czyli nie udało się osiągnąć 100% redukcji tego drobnoustroju w badanych rozpuszczalnikach.

Z uzyskanych badań fizykochemicznych rozpuszczalników „przemysłowych” nr 1, 2, 3, 4 oraz nr I, III, IV wynika, że wszystkie rozpuszczalniki pod względem fizykochemicznym były trwałe (pkt. 9.3., Tabele 54-56) i mogą być przydatne w technologii „przemysłowych” kropli do oczu z cefepimem.

Ocena fizykochemiczna 1% i 5% kropli do oczu z cefepimem w wersjach „przemysłowych” sporządzonych przy użyciu rozpuszczalników świeżo sporządzonych oraz poddanych testowi przyspieszonego starzenia.

- **Ocena organoleptyczna kropli „przemysłowych”**

Świeżo sporządzone 1% krople z cefepimem (wersje: 1P0, 2P0, 3P0, 4P0) oraz 1% krople, w których został zastosowany rozpuszczalnik poddany wcześniej testowi przyspieszonego starzenia (wersje kropli: 1P6, 2P6, 3P6, 4P6) były bezbarwne i przezroczyste. Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C krople przybrały barwę jasnożółtą i posiadały intensywniejszy zapach. W wersjach kropli konserwowanych dominował zapach alkoholu β -fenyloetylowego (Tabela 60).

Świeżo sporządzone 5% krople z cefepimem (wersje kropli nr: IP0, IIP0, IVP0) oraz 5% krople sporządzone na rozpuszczalniku poddanym testowi przyspieszonego starzenia (wersje kropli nr: IP6, IIP6, IVP6) były przezroczyste i miały żółte zabarwienie. Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C żółte zabarwienie uległo pogłębieniu oraz wyczuwalny był intensywniejszy zapach produktów rozkładu. W kroplach konserwowanych dominował, tak jak w kroplach 1%, zapach alkoholu β -fenyloetylowego (Tabela 60).

- **pH kropli „przemysłowych”**

1% krople „przemysłowe” w wersjach nr: 1P0, 2P0, 3P0, 4P0, 1P6, 2P6, 3P6, 4P6 oraz 5% krople „przemysłowe” w wersjach nr: IP0, IIP0, IVP0 i IP6, IIP6, IVP6 wykazywały pH 5,59-6,24. Po 30 dniach przechowywania w temperaturze 4°C pH kropli nie uległo istotnym zmianom i wynosiło 5,85-6,31 (Tabela 61, Rycina 77-78).

- **Ciśnienie osmotyczne kropli „przemysłowych”**

Ciśnienie osmotyczne kropli „przemysłowych” przygotowanych na bazie rozpuszczalników świeżo sporządzonych i poddanych wcześniej testowi przyspieszonego starzenia dla poszczególnych stężeń było zbliżone. Po 30 dniach przechowywania ciśnienie osmotyczne w 1% i 5% kroplach „przemysłowych” nie uległo istotnym zmianom (Tabela 62, 83 oraz Rycina 79-80).

Tabela 83. Zestawienie wyników ciśnienia osmotycznego (mOsm/l) w 1% i w 5% kroplach do oczu z cefepimem wersji recepturowych (R), „przemysłowych”(P) - przygotowanych na świeżo sporządzonych rozpuszczalnikach (P0) oraz sporządzonych na rozpuszczalnikach poddanych testowi przyspieszonego starzenia (P6)

Numer wersji kropli		1R	1P0	1P6	2R	2P0	2P6	3R	3P0	3P6	4R	4P0	4P6	
Ciśnienie osmotyczne kropli (mOsm/l)	1%	Krople świeżo sporządzone	374	391	399	398	421	425	404	439	451	411	456	440
		Po 30 dniach przechowywania w temp.4°C	377	398	404	404	424	428	431	443	456	439	460	456
Numer wersji kropli		IR	IP0	IP6	IIR	IIP0	IIP6	IIIR	IIIP0	IIIP6	IVR	IVP0	IVP6	
Ciśnienie osmotyczne kropli (mOsm/l)	5%	Krople świeżo sporządzone	696	549	552	-	-	-	704	571	580	728	620	613
		Po 30 dniach przechowywania w temp.4°C	698	546	559	-	-	-	710	589	595	724	652	645

R - wersje recepturowe 1% i 5% kropli

P0 - wersje „przemysłowe” kropli sporządzone na świeżo sporządzonym rozpuszczalniku

P6 - wersje „przemysłowe” kropli sporządzone na rozpuszczalniku poddanym testowi przyspieszonego starzenia.

Dane na podstawie tabeli 17 i 62.

- **Stężenie cefepimu w 1% i 5% kroplach „przemysłowych” przechowywanych w temperaturze 4°C (trwałość cefepimu w kroplach „przemysłowych”)**

Tabela 84. Trwałość 1% i 5% roztworów wodnych cefepimu oraz kropli 1% i 5% recepturowych i „przemysłowych” wyrażona w dniach, w których utrzymywało się jeszcze 90% zawartość cefepimu w odniesieniu do zawartości początkowej

Krople	Dzień, po którym nastąpił ponad 10% spadek zawartości cefepimu w kroplach przechowywanych w temp.4°C			
	Krople 1%		Krople 5%	
	Nr wersji	dzień	Nr wersji	dzień
Roztwory wodne cefepimu	0_(1%)	24	0_(5%)	18
Krople recepturowe wersje R	1R	27	IR	18
	2R	27	IaR	18
	3R	24	IIIR	12
	3aR	21	IIIaR	21
	4R	27	IVR	12
	4aR	21	IVaR	21
			IVbR	12
Krople „przemysłowe” w wersjach P0	1P0	27	IP0	18
	2P0	21	-	
	3P0	24	IIIP0	15
	4P0	21	IVP0	18
Krople „przemysłowe” w wersjach P6	1P6	24	IP6	18
	2P6	21	-	
	3P6	24	IIIP6	15
	4P6	21	IVP6	21

Trwałość cefepimu w 1% i 5% kroplach „przemysłowych” określono metodą HPLC opisaną w pkt. 8. Wyniki trwałości cefepimu w 1% kroplach „przemysłowych” były zbliżone do trwałości cefepimu w 1% kroplach recepturowych. Trwałość cefepimu w 1% kroplach, wersji recepturowych przechowywanych w temperaturze 4°C wynosiła od 21 do 27 dni, w 1% kroplach „przemysłowych” przygotowanych na rozpuszczalnikach świeżo sporządzonych (wersje P0) trwałość wynosiła od 21 do 24 dni i prawie taką samą trwałość cefepimu wyznaczono w 1% kroplach „przemysłowych” sporządzonych na bazie rozpuszczalników poddanych testowi przyspieszonego starzenia (wersje P6).

W 5% kroplach recepturowych trwałość cefepimu była niższa w porównaniu z trwałością cefepimu jaką odnotowano w 1% kroplach recepturowych i wyniosła od 12 do 21 dni.

W zależności od wersji krótsza, 12-dniowa trwałość cefepimu związana była z zastosowaniem w kroplach buforu II, który nie nadawał się do sporządzenia 5% kropli z cefepimem z uwagi na zbyt wysokie stężenie składników buforu i przez to zbyt wysokie ciśnienie osmotyczne samego buforu wynoszące 568 mOsm/l.

W technologii 1% i 5% kropli „przemysłowych” zastosowano wyłącznie bufony I i III (Tabela 9 i 13), które weszły w skład rozpuszczalników nr 1, 2, 3, 4 oraz nr I, III i IV.

Spośród zaprojektowanych wersji recepturowych 1% kropli z cefepimem można jako optymalne pod względem właściwości fizycznych (pH, ciśnienie osmotyczne, lepkość) oraz z uwagi na najdłuższą trwałość (27 dni) zarekomendować wersję 1R (buforowane, niekonserwowane), 2R (buforowane, konserwowane) oraz 4R (buforowane, konserwowane, ze zwiększoną lepkością).

Wśród wersji 5% kropli recepturowych szczególnie na uwagę zasługuje formuacja z 21-dniową trwałością cefepimu: IIIaR (krople buforowane, ze zwiększoną lepkością) i IVaR (krople buforowane, konserwowane i ze zwiększoną lepkością) (Tabela 84).

Wszystkie zaprojektowane wersje 1% i 5% kropli „przemysłowych” spełniły założenia celu pracy pod względem właściwości fizycznych oraz trwałości cefepimu w kroplach.

Koncepcja rozpuszczalników cefepimu zastosowanych w 1% i 5% kroplach „przemysłowych” stanowi technologię, która może być wykorzystana w produkcji nowej, okulistycznej postaci leku z antybiotykiem o szczególnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych wobec bakterii wywołujących zakażenia oczu, wśród których zakażenie patogenami z rodzaju *Pseudomonas* stanowi szczególne zagrożenie utraty wzroku.

VI. Wnioski

1. Substancje pomocnicze zastosowane w 1% i 5% recepturowych i „przemysłowych” kroplach z cefepimem: bufor cytrynianowy, środki konserwujące (boran fenylortęciowy i alkohol β -fenyloetylowy) oraz alkohol poliwinylowy (PVA) były niezbędne w składzie kropli, w celu doprowadzenia ich do akceptowalnego dla tej postaci leku: pH, ciśnienia osmotycznego oraz lepkości, ponadto zastosowane środki pomocnicze zagwarantowały trwałość cefepimu w kroplach zgodną z założeniami celu pracy, stwarzającą możliwość prowadzenia kuracji przez kilkanaście dni (krople konserwowane) przy użyciu jednego opakowania kropli.
2. Na trwałość cefepimu w 1% i 5% kroplach recepturowych i „przemysłowych” wywierały wpływ takie czynniki jak: temperatura przechowywania, stężenie cefepimu w kroplach, rodzaj rozpuszczalnika, substancje konserwujące i substancja zwiększająca lepkość kropli (PVA).
3. Decydujący wpływ na trwałość cefepimu w 1% i 5% kroplach recepturowych oraz kroplach „przemysłowych”, po połączeniu cefepimu z rozpuszczalnikiem, stanowiła temperatura przechowywania kropli. Krople powinny być chronione przed światłem, przechowywane w temperaturze nie wyższej niż 4°C.
4. W buforowaniu 1% i 5% recepturowych i „przemysłowych” kropli powinien być stosowany bufor cytrynianowy o pH 6,05-6,20 i ciśnieniu osmotycznym 298 mOsm/l. Krople tak zbuforowane wykazują korzystniejsze dla oka ciśnienie osmotyczne: 374-398 mOsm/l (krople 1%) i 553-585 mOsm/l (krople 5%) oraz wyższą trwałość cefepimu w porównaniu z kroplami buforowanymi buforem o pH 6,05 i ciśnieniu osmotycznym 586 mOsm/l.
5. W zwiększaniu lepkości 1% i 5% kropli recepturowych i „przemysłowych” alkoholem poliwinylowym (PVA) ważne jest jego stężenie, które w kroplach nie powinno przekraczać 2%. Wyższe stężenie PVA obniża trwałość cefepimu w kroplach.

6. Stężenie PVA wynoszące w kroplach 1,91% może być stosowane w zapobieganiu interakcji farmaceutycznej pomiędzy cefepimem, a boranem fenylortęciowym w 5% kroplach recepturowych i „przemysłowych”.
7. Substancje pomocnicze: tiomersal, chlorek benzalkoniowy, dioctan chlorheksydyny nie mogą być stosowane w konserwowaniu 1% i 5% kropli do oczu cefepimem z uwagi na interakcje farmaceutyczne, które zachodzą między tymi środkami konserwującymi a cefepimem.
8. 1% jałowe, wodne, niebuforowane roztwory cefepimu nie mogą być stosowane w miejscowym leczeniu zakażeń oczu z uwagi na ich silną hipoosmotyczność w stosunku do płynu łzowego. 5% niebuforowane jałowe roztwory cefepimu mogą być stosowane miejscowo jako krople do oczu, ponieważ ich właściwości fizyczne: pH oraz ciśnienie osmotyczne znajdują się w granicach tolerancji oka, były zbliżone do pH i ciśnienia osmotycznego płynu łzowego.
9. Właściwości fizyczne rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych”: pH, ciśnienie osmotyczne, lepkość oraz trwałość określone testem przyspieszonym i długoterminowym według ICH oraz także skuteczność środków konserwujących w rozpuszczalnikach zawierających boran fenylortęciowy i alkohol β -fenyloetylowy, warunkują zgodność kropli „przemysłowych” z wymaganiami farmakopealnymi oraz gwarantują trwałość cefepimu odpowiadającą założeniom przyjętym w celu pracy.
10. Krótkotrwała ekspozycja rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych” na temperaturę wyższą niż deklarowana temperatura przechowywania wynosząca $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ nie wpływa w sposób istotny na właściwości fizyczne oraz trwałość cefepimu w kroplach.
11. Zastosowana w badaniach metoda ilościowego oznaczania cefepimu w 1% i 5% recepturowych i „przemysłowych” kroplach do oczu przytoczona w Farmakopei Amerykańskiej (USP 32) jest przydatna w określeniu stężenia antybiotyku w kroplach świeżo sporządzonych i w czasie ich przechowywania w temperaturze 4°C i 20°C . Metoda

charakteryzuje się wysoką specyficnością, dokładnością, precyzją oraz liniowością w wymaganym zakresie stężeń. Badanie elastyczności metody potwierdza brak wpływu niewielkich zmian w składzie eluenta oraz temperatury kolumny na wyniki parametrów analizy chromatograficznej.

12. Warunkiem realizacji technologicznej koncepcji sporządzania 1% i 5% kropli „przemysłowych”, oprócz zaprojektowanego w badaniach składu, sposobu sporządzania oraz przestrzegania ustalonych warunków przechowywania kropli, jest zastosowanie dwukomorowego opakowania, w którym jedna komora oddzielona szczelnie od drugiej komory zawierałaby suchą, jałową postać antybiotyku, druga komora wypełniona byłaby jałowym rozpuszczalnikiem o określonych parametrach fizycznych.
13. Opracowana koncepcja technologii 1% i 5% recepturowych i „przemysłowych” kropli do oczu z cefepimem może być uznana za nowatorską propozycję wykorzystania cefepimu w okulistyce w miejscowym leczeniu zakażeń oczu, w szczególności w leczeniu zakażeń wyjątkowo groźnymi dla oka patogenami z rodzaju *Pseudomonas*.

VII. Streszczenie

Cel pracy stanowiły badania dotyczące technologii 1% i 5% (w/w) recepturowych i „przemysłowych” kropli do oczu z cefepimem t.j. cefalosporyną IV generacji, charakteryzującą się szerokim zakresem działania bakteriobójczego wobec drobnoustrojów Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz wyjątkową opornością na działanie β -laktamaz plazmidowych i chromosomalnych. W uzasadnieniu zastosowania cefepimu w kroplach do oczu wzięto pod uwagę szczególne właściwości przeciwdrobnoustrojowe cefepimu, zwłaszcza przeciw wybitnie niebezpiecznym dla oczu szczepom z rodzaju *Pseudomonas* oraz brak na polskim i światowym rynku farmaceutycznym okulistycznych postaci leku z cefepimem o działaniu miejscowym. Ponadto w literaturze naukowej brakuje jakichkolwiek informacji dotyczących technologii recepturowych oraz handlowych okulistycznych postaci leków z zastosowaniem tego antybiotyku. W składzie kropli zastosowano niezbędne substancje pomocnicze: bufor cytrynianowy, środki konserwujące (boran fenylortęciowy i alkohol β -fenyloetylowy) oraz poliwinylalkohol (PVA).

W warunkach aseptycznych sporządzono zbuforowane 1% i 5% recepturowe krople w wersjach niekonserwowanych, konserwowanych, bez zwiększonej lepkości, ze zwiększoną lepkością oraz krople konserwowane i ze zwiększoną lepkością. Krople przechowywano przez 30 dni w temperaturze 4°C, chroniąc od światła. Dla porównania intensywności zmian fizykochemicznych zachodzących w kroplach w zależności od temperatury ich przechowywania, krople przechowywano również w temperaturze 20°C. W odstępach trzydniowych krople poddawano ocenie organoleptycznej (przezroczystość, zabarwienie, zapach), ocenie fizykochemicznej, w ramach której kontrolowano: pH, ciśnienie osmotyczne, lepkość (w kroplach z zawartością poliwinylalkoholu (PVA)) oraz trwałość cefepimu, którą badano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC). Metoda HPLC została zwalidowana pod kątem specyficzności, liniowości, dokładności, precyzji oraz elastyczności. Wyznaczono również granicę wykrywalności i oznaczalności.

Układ odniesienia przy ocenie zastosowanych w kroplach substancji pomocniczych na trwałość cefepimu stanowiły równolegle sporządzone 1% i 5% roztwory wodne cefepimu, przechowywane i badane w identycznych warunkach. Na trwałość cefepimu w 1% i 5% recepturowych kroplach w różnym stopniu wywierało wpływ kilka czynników takich jak: temperatura przechowywania, stężenie cefepimu, skład buforów cytrynianowych, substancje konserwujące i stężenie poliwinylalkoholu. Dominujący jednak wpływ na trwałość cefepimu w kroplach wywierała temperatura ich przechowywania, która nie powinna przekraczać 4°C. Trwałość cefepimu w kroplach recepturowych, przechowywanych w temperaturze 4°C określona

czasem, po którym następował 10% spadek jego stężenia, w zależności od składu kropli wynosiła: od 21 do 27 dni (krople 1%) oraz od 12 do 21 dni (krople 5%).

Otrzymane wyniki badań fizykochemicznych kropli recepturowych, w szczególności wyniki dotyczące trwałości cefepimu w kroplach, stanowiły punkt wyjściowy do opracowania składu i sposobu sporządzania rozpuszczalników do 1% i 5% kropli „przemysłowych”.

Dokonano oceny jakościowej świeżo sporządzonych rozpuszczalników oraz zgodnie z wytycznymi ICH Q1A(R2) badano rozpuszczalniki w czasie ich sześciomiesięcznego przechowywania w komorach klimatycznych w temperaturze 40°C, przy wilgotności względnej 75% RH ± 5% RH i w czasie dwunastomiesięcznego przechowywania w temperaturze 25°C, przy wilgotności względnej 60% RH ± 5% RH. Ponadto po przeprowadzonym teście długoterminowym, w przypadku rozpuszczalników konserwowanych, wykonano badania skuteczności przeciwdrobnoustrojowej środków konserwujących w rozpuszczalnikach metodą wg FPVII.

1% i 5% krople „przemysłowe” wykonano w warunkach aseptycznych poprzez bezpośrednie połączenie cefepimu z odpowiednią wersją rozpuszczalnika, co miało odwzorowywać połączenie zawartości dwukomorowego opakowania handlowego, gdzie w jednej komorze znajdowałaby się sucha, liofilizowana postać antybiotyku, a w drugiej rozpuszczalnik. Połączenie zawartości obu komór powinno następować bezpośrednio przed rozpoczęciem kuracji przez pacjenta, a krople tak sporządzone powinny być przechowywane analogicznie jak krople recepturowe w temperaturze 4°C.

Krople „przemysłowe” z 1% i 5% zawartością cefepimu przechowywano przez 30 dni bez dostępu światła, wyłącznie w temperaturze 4°C. Analogicznie jak w przypadku kropli recepturowych, w trydziennych odstępach czasu dokonywano oceny organoleptycznej i fizykochemicznej kropli „przemysłowych”, zgodnie z kryteriami przyjętymi dla kropli recepturowych.

1% i 5% krople „przemysłowe” wykonano na świeżo sporządzonych rozpuszczalnikach oraz na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej testowi przyspieszonego starzenia. Z przeprowadzonych badań wynikało, że krótkotrwała ekspozycja rozpuszczalników na temperaturę wyższą niż deklarowana temperatura przechowywania, wynosząca 25°C ± 2°C nie powinna negatywnie wpływać na właściwości fizyczne oraz trwałość cefepimu w kroplach przechowywanych w temperaturze 4°C, ponieważ 10% spadek zawartości

antybiotyku następował podobnie jak w przypadku kropli „przemysłowych”, sporządzonych na świeżo wykonanym rozpuszczalniku dopiero po kilkunastu dniach przechowywania kropli.

W przypadku 1% kropli „przemysłowych”, wykonanych na rozpuszczalnikach świeżo sporządzonych, 10% spadek zawartości cefepimu w kroplach, w zależności od ich składu następował od 21 dnia do 27 dni. W 1% kroplach sporządzonych na rozpuszczalnikach poddanych wcześniej procesowi przyspieszonego starzenia okres ten był zbliżony i wynosił od 21 do 24 dni. Nieco krótszą trwałość cefepimu w kroplach odnotowano w 5% kroplach „przemysłowych”: 15-18 dni (5% krople wykonane na rozpuszczalniku poddanym procesowi przyspieszonego starzenia). Trwałość konserwowanych 1% i 5% kropli recepturowych, z uwagi na obecność w ich składzie konserwantów oraz 1% i 5% kropli „przemysłowych” konserwowanych i niekonserwowanych zabezpieczonych przed wtórnym skażeniem drobnoustrojami przez odpowiednie opakowanie kropli, stwarza możliwość prowadzenia kuracji przez kilkanaście dni, pod warunkiem, że krople w czasie ich stosowania będą przechowywane w temperaturze nie wyższej niż 4°C.

Koncepcja rozpuszczalników zastosowanych w 1% i 5% kroplach „przemysłowych” stanowi technologię, która mogłaby być wykorzystana w produkcji nowej, handlowej, okulistycznej postaci leku z antybiotykiem o szczególnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych wobec bakterii wywołujących zakażenia oczu, wśród których zakażenie patogenami z rodzaju *Pseudomonas* stanowi bardzo duże zagrożenie utraty wzroku.

VII. Summary

„Stability of cefepime in eye drops”

The dissertation concerns the research on the development of the technology of 1% and 5% cefepime eyedrops in both a pharmaceutical version and a version for serial production. Cefepime is a fourth generation cephalosporin, that is a broad-spectrum drug characterized by a powerful germicidal effect on Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as a high resistance to plasmid-encoded and chromosomal-mediated Beta-lactamases. The use of cefepime in eyedrops is justified by its exceptional antibacterial properties, especially against highly dangerous *Pseudomonas* strains, as well as the lack of an ophthalmological form of cefepime on both Polish and global pharmaceutical market. Moreover, there seems to be no scientific publications concerning a technology of either a pharmaceutical or a commercial ophthalmological form of the aforementioned antibiotic.

The composition of the eyedrops contains the following essential additives: citric buffers, preservatives (phenylmercuric borate and beta-phenylethyl alcohol) and PVA. A pharmaceutical version of buffered 1% and 5% eyedrops was prepared in sterile conditions in the following variants: with preservatives, without preservatives, with enhanced viscosity, without enhanced viscosity, as well as with both preservatives and enhanced viscosity. The eyedrops were stored for 30 days at the temperature of 4°C, away from the light. For comparison of the intensity of physicochemical changes, the eyedrops were also stored at the temperature of 20°C.

The organoleptic evaluation (of transparency, colour, and odour), the physicochemical evaluation (of pH, osmotic pressure, and viscosity (in variants containing PVA)), and cefepime stability evaluation (by means of reversed-phase high performance liquid chromatography RP-HPLC) were conducted every three days.

The HPLC method used to indicate the cefepime content was validated in terms of specificity, accuracy, precision and linearity, and elasticity. The limits of detection and quantitation for cefepime were also established.

The influence of the additives on the stability of cefepime in 1% and 5% pharmaceutical version of the eyedrops was compared against the 1% and 5% aqueous solution of cefepime prepared at the same time as a frame of reference and stored in the exact same conditions. The stability of cefepime was affected by the temperature of storage, cefepime concentration, citric buffers composition, conservatives, and PVA concentration. Out of these, the temperature of storage was the most significant factor; it was established that it should not exceed 4°C.

The stability of cefepime in the pharmaceutical versions of the eyedrops stored at the temperature of 4°C, measured by the time after which a 10% drop in the levels of the antibiotic could be detected, was 21 to 27 days (for 1% cefepime eyedrops) and 12 to 21 days (for 5% cefepime eyedrops).

The results of the physicochemical evaluation of the pharmaceutical version of the eyedrops, especially the data concerning the stability of cefepime, were used as a starting point for the development of the composition of solvents for a serial production version of 1% and 5% cefepime eyedrops.

The quality evaluation of the solvents was performed, in accordance with the ICHQIA (R2) requirements, during a 6-month-long storage in climatic chambers at 40°C and relative humidity of 75% RH \pm 5% RH and a 12-month-long storage at 25°C \pm 2° at the relative humidity of 60% RH \pm 5% RH. Moreover, after a long-term storage test, a test of antibacterial efficiency of the conservatives added to certain solvents was conducted using the FPVII standard method.

The version for a serial production of 1% and 5% cefepime eyedrops was made in sterile environment by mixing cefepime directly with a solvent, which was intended to emulate a potential mass production two-compartment container designed to store a freeze-dried powder in one compartment and the solvent in the other. The two substances should be mixed directly before the start of the treatment, and the eyedrops prepared in such way should be stored – just like a pharmaceutical version – at the temperature of 4°C.

The version for a serial production of 1% and 5% cefepime eyedrops was stored for 30 days away from light, at the temperature of 4°C only. The organoleptic and the physicochemical properties of the serial version were evaluated every 3 days and tested against the same criteria as the pharmaceutical version of the eyedrops.

The version for a serial production of 1% and 5% cefepime eyedrops was prepared in variants with newly made solvents as well as the solvents which had undergone the accelerated aging test.

The examination showed that a short-term exposure of the solvents to a temperature higher than the declared 25°C \pm 2°C should not negatively affect the physical properties and the stability of cefepime in eyedrops stored at 4°C because the 10% loss in the antibiotic content took place only after a dozen or so days of storage, just as it was the case with the serial version of the eyedrops prepared using newly made solvent.

When it comes to the serial version of 1% eyedrops prepared using newly made solvent, the 10% loss in the antibiotic content took place after the period of 21 to 27 days, depending on the solvents' composition. In the case of the 1% eyedrops prepared using solvents which had

undergone the accelerated aging process, the 10% loss occurred after a similarly period, that is after 21 to 24 days.

The stability of cefepime in the serial version of 5% eyedrops (prepared using aged solvent) was shorter and lasted for 15 to 18 days.

The stability of the pharmaceutical version of the eyedrops with preservatives and the serial version of the eyedrops with and without preservatives protected against bacterial recontamination by a right container allows for a treatment lasting a dozen or so days; however, throughout the treatment the eyedrops must be stored at the maximum temperature of 4°C.

The idea for solvents used in the serial version of 1% and 5% eyedrops is a technology which could be used in mass production of a new ophthalmological form of a drug with the antibiotic characterized by exceptional antibacterial properties, highly effective against bacteria causing eye infections, such as those of *Pseudomonas* strain, which entail great risk of losing eyesight.

VIII. Piśmiennictwo

1. S. Burgalassi, P. Chetoni, M.F. Saettone: Hydrogels for ocular delivery of pilocarpine. Preliminary evaluation in rabbits of the influence of viscosity and of drug solubility. *Eur. J. Biopharm*, 42, 385-392, 1996.
2. E. Mathiowitz: *Encyclopedia of controlled drug delivery*. A.Wiley-Interscience Publication John Wiley&Sons. 1999.
3. N.M. Davis, S.J. Farr, J. Hadgraft, I.W. Kellaway: Evaluation of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. I. Viscous Solutions. *Pharm. Res*, 1991, 8, 1039-1043.
4. S.G. Deshpande, S. Shirokolar: Sustained release ophthalmic formulation of pilocarpine. *J. Pharm. Pharmacol*, 41, 197-200, 1989.
5. S. Mengi, S.G. Deshpande: Development and evaluation of flurbiprofen hydrogels on the breakdown of the blood/aqueous humor barrier. *STP Pharm. Sci*, 2, 118 - 124, 1992.
6. M. Wen-Di, Hui Xu, Chao Wang, Shu-Fang Nie, Wei-San Pan: Pluronic F127-g-poly (acrylic acid) copolymers as in situ gelling vehicle for ophthalmic drug delivery system. *Int. J. Pharm*, 350, 247-256, 2008.
7. S. Song, B. Kim: Characteristic rheological features of PVA solutions in water-containing solvents with different hydration states. *Polymer*, 47:915-921, 2006.
8. R. Chudzikowski: Polyvinyl alcohol. *Manuf. Chem. Aerosol. News*, 41 (7), 31-37, 1970.
9. C.A. Finch: *Polyvinyl Alcohol Developments*. Chichester: Wiley, 1992.
10. A. Ludwig: The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev*, 57, 1595-1639, 2005.
11. T. Gratieri, M.G. Gelfuso, E.M. Rocha, V.H. Sarmiento, O. Freitas, R.F.V. Lopez: A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. *Europ. J. Pharm. and Biopharm*, 75, 186-193, 2010.
12. K.B. Nanjawade, F.V. Manvi, A.S. Manjappa: In situ forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 122, 119-134, 2007.
13. H. Wu, Z. Liu, J. Peng, L. Li, N. Li, J. Li, H. Pan: Design and evaluation of baicalin containing in situ pH-triggered gelling system for sustained ophthalmic drug delivery. *Int. J. Pharm*, 410, 31-40, 2011.

14. Y. Ali, K. Lehmussaari: Industrial perspective in ocular drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev*, 58, 1258-1268, 2006.
15. R. Jachowicz: *Leki stosowane w terapii okulistycznej*, Biblioteka farmaceutyczna „Polfa” Sp. z o.o. Warszawa 2001.
16. M. Hornof, W. Weyenberg, A. Ludwig, A. Bernkop-Schnürch: Mucoadhesive ocular in-sert based on thiolated poly(acrylic acid): development and in vivo evaluation in humans. *Journal of Controlled Release*, 89 (419-428), 2003.
17. M.F. Saettone, P. Chetoni, M.T. Torracca, B. Giannacini, L. Naber, U. Conte, M.E. Sangalli, A. Gazzaniga: Application of the compression technique to the manufacture of pilocarpine ophthalmic inserts. *Acta Pharm.Technol*, 36, 15-19, 1990.
18. M.F. Saettone, M.T. Torracca, A. Pagano, B. Ginnaccini, L. Rodriguez, M. Cini: Controlled release of pilocarpine from coated polymeric ophthalmic inserts prepared by extrusion. *Int. J. Pharm*, 86, 159-166, 1992.
19. R.H. Müller, G.E. Hildebrand: *Technologia nowoczesnych postaci leków*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2003.
20. H. Sasako, T. Nagano, K. Sakanaka, S. Kawakami, K. Nishida, J. Nakamura, N. Ichikawa, J. Iwashita, T. Nakamura, M. Nakashima: One-side-coated insert as a unique ophthalmic drug delivery system. *Journal of Controlled Release*, 92, 241-247, 2003.
21. V. Baeyens, V. Klatsatos, B. Boisrame, M. Fathi, R. Gurny: Evaluation of soluble bioadhesive ophtalmic drug inserts (BODI) for prolonged release of gentamicin: lachrymal phramacokinetics and ocular tolerance. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 14, 3, 1998.
22. M.F. Saettone, B. Giannacini, P. Chetoni, L. Mariotti – Bianchi, U. Conte, M.E. Sagalli: Controlled release of timolol maleate from coated ophtalmic mini-tablets prepared by compression. *Int. J. Pharm*, 126, 79-82, 1995.
23. C.G. Shayne: *Pharmaceutical manufacturing handbook. Production and processes*, Wiley-Interscience, 2008.
24. M.A. Kassem, A. Rahman, M.M. Ghorab, M.B. Ahmed, R.M. Khalil: Nanosuspensions as an ophthalmic delivery system for certain glucocorticoid drugs. *Int. J. Pharm*, 340, 126-133, 2007.

25. I. Genta, B. Conti, P. Pergugini, F. Pavanetto, A. Spadaro, G. Puglisi: Bioadhesive microspheres for ophthalmic administration of acyclovir. *J. Pharm. Pharmacol*, 49, 737-742, 1997.
26. T. Moritera, Y. Ogura, N. Yoshinura, Y. Honda, et al.: Biodegradable microspheres containing adriamycin in treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Inves. Ophth. Vis. Sci*, 33, 3125-3130, 1992.
27. T. Moritera, Y. Ogura, Y. Honda, R. Wada, S.H. Hyon, Y. Ikada: Microspheres of biodegradable polymers as a drug delivery system in the vitreous. *Invest Ophth. Vis. Sci*, 32, 1785-1790, 1991.
28. K. Kyyrönen, L. Hume, L. Benedetti, A. Urtti, E. Topp, V. Stella: Methylprednisolone esters of hyaluronic acid in ophthalmic drug delivery: in vitro and in vivo release studies. *Int. J. Pharm*, 280, 161-169, 1997.
29. S.L. Leucuta: The kinetics of in vitro release and the pharmacokinetics of miotic response in rabbits of gelatin and albumin microspheres with pilocarpine. *Int. J. Pharm*, 54, 71-78, 1989.
30. A.K. Zimmer, H. Zerde, J. Kreuter: Evaluation of pilocarpine loaded albumin particles as drug delivery systems for controlled delivery in the eye. I. In vitro and in vivo characterisation. *J. Control. Release*, 32, 57-70, 1994.
31. P. Giunchedi, U. Conte, P. Chetoni, M.F. Saettone: Pectin microspheres as ophthalmic carriers of piroxicam: evaluation in vitro and in vivo in albino rabbits. *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 9, 1-7, 1997.
32. P. Calvao, A. Schanchez, J. Martinez, M.J. Lopez, M. Calonge, J.C. Pastor, M.J. Alonso: Polyesters nanocapsules as new topical ocular delivery systems for cyclosporins A. *Pharm. Research*, 13, 311-315, 1996.
33. L. Marchal-Heussler, P. Maincent, M. Hoffman, J. Spitter, P. Couveur: Antiglaucomatous activity of betaxolol chlorhydrate sorbed onto different isobutyloxyanoacrylate nanoparticles preparations. *Int. J. Pharm*, 58, 115-122, 1990.
34. M.C. Bonferoni, P. Chetoni, P. Giunchedi, S. Rossi, F. Ferrari, S. Burgalassi, C. Caramella: Carrageenan-gelatin mucoadhesive systems for ion-exchange based ophthalmic delivery: in vitro and preliminary in vivo studies. *Europ. J. Pharm and Biopharm*, 57, 465-472, 2004.

35. M. Wen-Di, Hui Xu, Chao Wang, Shu-Fang Nie, Wei-San Pan: Pluronic F127-g-poly (acrylic acid) copolymers as in situ gelling vehicle for ophthalmic drug delivery system. *Int. J. Pharm*, 350, 247-256, 2008.
36. M. Fuente., M. Ravina, P. Paolicelli, A. Sanchez, B. Sejo, M.J. Alonso: Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev*, 62, 100-117, 2010.
37. A. Zimmer, J. Kreuter: Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. *Advanced Drug Delivery Rev.*, 16, 61-73, 1995.
38. K. Singh, M. Mezei: Liposomal ophthalmic drug delivery system. I. Triamcinolone acetonide. *Int. J. Pharm*, 16, 339-334, 1983.
39. S.H. Klang, A. Baszkin, S. Benita: The stability of piroxicam incorporated in positively charged submicron emulsion for ocular administration. *Int. J. Pharm*, 132, 33-44, 1996.
40. I.K. Reddy: Ocular therapeutics and drug delivery a multi disciplinary approach. *Thenomic Publishing Company Lancaster Basel*, 1996.
41. S.H. Klang, C.S. Siganos, S. Benita, J. Frucht Pery: Evaluation of positively charged submicron emulsions of piroxicam on rabbit corneum healing process following alkali burn. *J. Contr. Release*, 57, 19-27, 1999.
42. J. Siebenbrodt, S. Keipert: Poloxamer– systems as potential ophthalmics II. Microemulsions. *Eur. J. Biopharm*, 39, 25-30, 1993.
43. R. Jachowicz, S. Chłosta: Badanie żeli mikroemulsyjnych z 5-fluorouracylem. *Farm. Pol*, 57, 170-174, 2001.
44. M.R. Gasco., M. Gallarate, M. Trotta., L. Bauchiero, E. Gremmo, O. Chappero: Microemulsions as topical delivery vehicles: ocular administration of maleinian timololu, *J. Pharm. & Biomed. Anal*, 7 (4), 433 – 439, 1989.
45. D. Gulsen, A. Chauhan: Dispersion of microemulsion drops in REMA hydrogel: as potential ophthalmic drug delivery vehicle, *Int. J. Pharm*, 292, 95 – 117, 2005.
46. J. Chan, G.M.M. Mghraby, J.P. Craig, R.G. Alany: Phase transition water-in-oil microemulsions as ocular drug delivery systems: In vitro and in vivo evaluation, *Int. J. Pharm*, 328, 65 – 71, 2007.
47. R.G. Alany, T. Rades, J. Nicoll, I.G. Tucker., N.M. Davies: w/o microemulsions for ocular delivery: evaluation of ocular irritation and precorneal retention. *J. Control. ReI*, 111, 145 – 152, 2006.

48. A. Habe, S. Keipert: Development and characterization of microemulsions for ocular application. *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 43, 179 – 183, 1997.
49. R. Jachowicz: Nowe kierunki badań nad formułowaniem preparatów do oczu. *Mikrobiologia Medycyna*, 3, 13-16, 1997.
50. A. Zejc, M. Gorczyca: *Chemia leków. Podręcznik dla studentów farmacji i farmaceutów*, PZWL 2008.
51. W. Hryniewicz, J. Mészáros: *Antybiotyki w profilaktyce i leczeniu zakażeń*, PZWL 2001.
52. D. Dzierżanowska: *Antybiotykoterapia praktyczna*, α -medica Press 2002.
53. A. Młynarczyk, M. Łuczak: Cefalosporyny IV generacji. *Zakażenia*, 2/2004.
54. H.P. Lambert, F.W. O'Grady: *Antybiotyki i chemioterapia*, Wydawnictwo Medyczne, Warszawa 1994.
55. A. Bartosińska: Trwałość cefepimu w 1% roztworach wodnych i 1% kroplach do oczu określona metodą HPLC. Praca Magisterska Collegium Medicum Bydgoszcz UMK Toruń, Toruń 2008.
56. *Farmakopea Polska VIII*, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2008, 1238-1239.
57. A. Alanis: Resistance to Antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*, 36, 697-705, 2005.
58. A. Sulikowska: Konsumpcja antybiotyków a narastanie oporności bakteryjnej, *Nowa Medycyna – Medycyna Zakażeń I* (9/1999).
59. P. Grzesiowski: Czy wyczerpią się zapasy antybiotyków, *Puls medycyny*, nr 1, 14.01.2009.
60. Bristol-Myers Squibb: Charakterystyka produktu leczniczego Maxipime[®] 01.06.2005.
61. M. Francois, J. Blais, S. Chamberland, M. Hoang, C. Park, Ch. Chan, K. Mathias, S. Hakem, K. Dupree, E. Liu, T. Nguyen, MN. Dudley: A New Cephalosporin with High Affinity for Penicillin-Binding Proteins, Including PBP 2a, and Stability to Staphylococcal Beta- Lactamases. *Antimicrob Agents and Chemother*, 2: 658– 664, 2003.
62. C. Fuda, M. Suvorov, SB. Vakulenko, S. Mobashery: The Basis for Resistance to β -Lactam Antibiotics by Penicillin-binding Protein 2a of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 39: 40802 – 40806, 2004.

63. S.R. Shaboury, G.A. Saleh, F.A. Mohamed, A.H. Rageh: Analysis of cephalosporin antibiotics, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45:1-19, 2007.
64. A. Kodym, T. Zawisza, B. Napierała, H. Kukuła: Influence of additives and storage temperature on physicochemical and microbiological properties of eye drops containing cefazolin. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 63 (507-513), 2006.
65. A. Kodym, T. Zawisza, B. Napierała, H. Kukuła: Influence of additives and storage temperature on physicochemical and microbiological properties of eye drops containing cefuroxime. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 63 (293-299), 2006.
66. A. Kodym, T. Zawisza, B. Napierała, H. Kukuła: Influence of additives and storage temperature on physicochemical and microbiological properties of eye drops containing ceftazidime. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 63 (225-234), 2006.
67. A. Kodym, M. Pawłowska, J.K. Rumiński A. Bartosińska, A. Kieliba: Stability of cefepime in aqueous eye drops. *Pharmazie*, 66 (1), 17-23, 2011.
68. A. Kodym, D. Hapka –Żmich, M. Gołąb, M. Gwizdała: Stability of ceftazidime in 1% and 5% buffered eye drops determined with HPLC method. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, 68 (1), 99-107, 2011.
69. A. Kodym, A. Wiśniewski, D. Kniola, M. Olejniczak: Stability of cefuroxime in 1% and 5% buffered eye drops determined with HPLC method. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, 68 (4), 555-564, 2011.
70. A. Kodym, P. Bilski, A. Domańska, Ł. Hełminiak: Physical and chemical properties and stability of sodium cefazolin in buffered eye drops determined with HPLC method. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, 69 (1), 95-105, 2012.
71. *International Journal of Pharmaceutical Compounding* 15(6) , 62, Nov/ Dec 2011.
72. W.F. Marshall, J.E. Blair: The Cephalosporins. *Mayo Clinic Proceedings*, 74: 187 – 195, 1999.
73. MJ. Pucci, J. Boice-Sowek, RE. Kessler, TJ. Dougherty: Comparison of Cefepime, Cefpirome, and Cefaclidine Binding Affinities for Penicillin-Binding Proteins in *Escherichia coli* K-12 and *Pseudomonas aeruginosa* SC8329. *Antimicrob Agents and Chemother*, 11: 2312 – 2317, 1991.
74. Jr. Sanders, JH. Tenney, RE. Kessler: Efficacy of Cefepime in Treatment of Infections Due to Multiply Resistant Enterobacter Species. *Clin Infect Dis*, 23: 454 – 461, 1996.

75. V. Huang, MJ. Rybak: Pharmacodynamics of Cefepime Alone and in Combination with Various Antimicrobials against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in an In Vitro Pharmacodynamic Infection Model. *Antimicrob Agents and Chemother*, 1: 302 – 308, 2005.
76. WR. Wilson: The Role of Fourth Generation Cephalosporins in the Treatment of Serious Infectious Diseases in Hospitalized Patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 31: 473 – 477, 1998.
77. JS. Lipman, SC. Wallis, C. Rickard: Low Plasma Cefepime Levels in Critically Ill Septic Patients: Pharmacokinetic Modeling Indicates Improved Troughs with Revised Dosing. *Antimicrob. Agents and Chemother*, 10: 2559 – 2561, 1999.
78. Handbook on Injectable Drugs, Bethesda, MD: American Society of Health-System Pharmacists. Electronic version, 2009.
79. W. Wilson: The role of Fourth-Generation Cephalosporins in the treatment of serious infectious diseases in hospitalized patients, *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 31, 1998.
80. W. Janiec, J. Kurpińska: *Farmakodynamika*, PZWL 2005.
81. J. Singh, A. Arrieta: New Cephalosporins, *Pediatric Infectious Diseases*, 10, 1999.
82. M. Rybak: The pharmacokinetic profile of a new generation of parenteral cephalosporin, *American Journal of Medicine*, 100 (6A):39S-44S 1996.
83. R. Delcenserie, M.P. Dellion-Lozingue, T. Yzet, B. Lepointe, L. Hary, R. Badoui, P. Verhaeghe, M. Andrejak, L. Dupas: Pancreatic concentrations of cefepime. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47:711-713, 2001.
84. A. Ozdamar, C. Aras, R. Ozturk, M. Karacorlu, S. Ozkan: Intravitreal penetration of cefepime after systemic administration to humans. *Ophthalmologica*, 216 (4):261-264 2002.
85. M. Ismail: Pharmacokinetics of cefepime administered by i.v. and i.m. routes to ewes. *J. Vet. Pharmacol. Therap*, 28:499-503, 2005.
86. E. Garces, M. Andrade de Anzambuja, D. Silva, J. Bragatti, T. Jacoby, F. Saldanha Thomé: Renal failure is a risk factor for cefepim induced encephalopathy. *Journal of Nephrology*, 21 (4):526-34, 2008.
87. F. Capparelli, M. Diaz, A. Hlavnik, N. Wainsztein, R. Leiguarda, M. Del Castillo: Cefepim - and cefixim-induced encephalopathy in a patient with a normal renal function. *Neurology*, 65 (11):1840, 2005.

88. M. Herrera, M. Navarro: Cefepim-induced encephalopathy in patients with renal failure, *Nefrologia*, 29 (2):181, 2009.
89. D. Yahov, M. Paul, A. Fraser, N. Sarid, L. Leibovici: Efficacy and safety of cefepime: systematic review and meta-analysis, *The Lancet Infectious Diseases*, 7 (5):338-48, 2007.
90. FDA. Early communication about an ongoing safety review: cefepime (marketed as Maxipime) November 2007.
91. Sweetman S.C. Martindle *The Complete Drug Reference*, London – Chicago, Pharmaceutical Press, 2007.
92. L. Krówczyński, E. Rybacki: *Interakcje w fazie farmaceutycznej*, PZWL, 1984.
93. N. Baririan, H. Chanteux, E. Viaene, H. Servais, P. Tulkens: Stability and compatibility study of cefepim in comparison with ceftazidime for potential administration by continuous infusion under conditions pertinent to ambulatory treatment of cystic fibrosis patients and to administration in intensive care units. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, (651-658) 2003.
94. B. Uslu, S.A. Ozkan, P. Zuman: Contribution to the alkaline degradation of cefepime. *Microchemical Journal*, 76:61-63, 2003.
95. V. Evagelou, A. Tsantili-Kakoulidou, M. Koupparis: Determination of the Dissociation Constants of the Cephalosporins Cefepime and Cefpirome Using UV Spectrometry and pH Potentiometry. *J Pharm Biomed Anal*, 31: 1119 – 1128, 2003.
96. JO. Fubara, RE. Notari: Influence of pH, Temperature and Buffers on Cefepime Degradation Kinetics and Stability Predictions in Aqueous Solutions. *J. Pharm. Sci*, 12, 1998.
97. S.A. Özkan, B. Uslu, P. Zuman: Electrochemical reduction and oxidation of the antibiotic cefepime at carbon electrode. *Analytica Chimica Acta*, 457:265, 274, 2002.
98. P. Sprauten, P. Beringer, S. Lousie, T. Synold, M. Gill: Stability and antibacterial activity of Cefepime during Continuous Infusion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(6):1991-4, 2003.
99. E. Bernard, D. Brelih, J.P. Bru, D. Chiche, I. Dujardin, R. Garaffo, F. Goldstein, I. Lavrard, G. Potel: Is there rationale for the continuous infusion of cefepime? A multidisciplinary approach. *Clin. Microbiol Infect*, 9:339-348, 2003.

100. J. Stewart, F. Warren, F. Maddox: Stability of cefepime hydrochloride injection in polypropylene syringes at -20°C, 4°C, and 22-24°C. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 56, (457-459) 1999.
101. S. Rabouan-Guyon, A. Guet, Ph. Courtois, D. Barthes: Stability study of cefepime in different infusion solutions. *International Journal of Pharmaceutics*, 154, (185-190) 1997.
102. A. Isla, A. Arzuaga, J. Maynar, A.R. Gascón, M.A. Solins, E. Corral, J.L. Pedraz: Determination of ceftazidime and cefepime in plasma and dialysate-ultrafiltrate from patients undergoing continous veno-venous hemodiafiltration by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39,996-1005, 2005.
103. Z. Witkiewicz: *Podstawy chromatografii*. Wydawnictwo Naukowo Techniczne, Warszawa, 2005.
104. United States Pharmacopeia 2009 (USP 32), The United States Pharmacopeial Convention, Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852 p.1832 – 1835.
105. F.C. Maddox, J.T. Stewart: HPLC determination of an aqueous cefepime and metronidazole mixture. *J. Liq. Chrom & Rel. Technol*, 22(18) 2807-2813, 1999.
106. J.A.O. González, F.J.J. Palacois, M.C. Mochón, F.J.B. Rosa: Simultaneous determination of cefepime and grepafloxacin in human urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36:117-123, 2004.
107. K.J.V. Lopez, D.F. Bertoluci, K.M. Vicente, A.M. Dell'Aquila, S.R.C. Jorge Santos: Simultaneous determination of cefepime, vancomycin and imipenem in human plasma of burn patients by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 860:241-245, 2007.
108. C. Farthing, D. Farthing, D.F. Brophy, T. Larus, L. Maynor, I. Fakhry, T.W.B. Gehr: High-performance Liquid chromatographic determination of cefepime and ceftazidime in human Plasma Dialysate. *Chromatographia*, 67:365-368, 2008.
109. F.J. Palacois, C.M. Mochón., J.C. Sanchez., M.A. Lopez., G.A. Perez.: Validation of an HPLC Method for Determination of Cefepime. Determination in Human Serum, Cerebrospinal Fluid, and Urine. *Pharmacokinetic Profiles. Chromatographia*, 62, (355-361), 2005.
110. W. Szczepaniak: *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.

111. V. Ródenas, A. Parra, J. Garcia-Villanova, M.D. Gómez: Simultaneous determination of cefepime and L-arginine in injections by second-derivative spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13: 1095-1099, 1995.
112. H. Liu, V.B. Sunderland: Validated method for simultaneous determination of cefepime and L-arginine in cefepime for injection by Capillary Zone Electrophoresis. *J. Liq. Chrom. & Related Technol*, 27 (19):3065-3076, 2004.
113. B. de Borba and J. Rohrer: Determination of Cefepime and Related Compounds Using HPLC with UV Detection, Dionex Corp. *The Applications Book*, December 2008.
114. P. Sprauten, PM. Beringer, SG. Louie, TW. Synold, MA. Gill: Stability and Antibacterial Activity of Cefepime during Continuous Infusion. *Antimicrob Agents and Chemiother*, 6: 1991 – 1994, 2003.
115. T. Zawisza: Technologia kropli do oczu z cefazoliną, cefuroksymem i z ceftazydymem. Praca doktorska wykonana w Katedrze Technologii Postaci Leku Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2004.
116. Karta charakterystyki(1-metylopirolidyna) Merck, Wg Dz. U. 11 poz. 84 z 2001 r. /dyrektywy UE 91/155/EEC, 05. 04. 2007.
117. S.T. Fogue, P. Kari, R Barbhaiya: N-oxidation of N-methylpyrrolidine released in vivo from cefepime. *Metabolism and Pharmacokinetics*. Department Pharmaceutical Research and Development Division, Bristol-Myers Company, March 4, 1987.
118. J.P. Payan, D. Beydon, J.P. Fabry, I. Boudry, B. Cossec, E. Ferrari: Toxicokinetics and Metabolism of N-[¹⁴C] Metylpyrrolidone in Male Sprague-Dawley Rats. A Saturable NMP Elimination Process. *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 30 (12):1418-1424, 2002.
119. G. Chen, G. Liu, F. Qin, Y. Wang: A Simple and sensitive GC method for determination of N-methylpyrrolidine in cefepime and its preparation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33 (797-801) 2003.
120. A. Mehdinia, A. Ghassempour, H. Rafati, R. Heydari: Determination of N-vinyl-2-pyrrolidone and N-methyl-2-pyrrolidone in drugs using polypyrrole-based headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-nitrogen-phosphorous detection. *Analytica Chimica Acta*, 587, (82-88), 2007.
121. H.Liou, V.B.Sunderland: Determination of N-methylpyrrolidine in cefepime for injection by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Chromatographia*, 59:653-657, 2004.

122. B. de Borba and J. Rohrer: Determination of N-methylpyrrolidine in Cefepime Using Reagent Free-Ion Chromatography. Dionex Corp. The Applications Book, December 2008.
123. Farmakopea Polska VII, Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, Warszawa, 2006.
124. Farmakopea Europejska VI, 2011, Europejska Dyrekcja Jakości Leków, Strasburg.
125. A. Shervington, R. AL-Tayyem: Arginine. Analytical profiles of drug substances and excipients, 27, 1-32, 2001.
126. Curtis Healthcare Sp. Z.O.O. Charakterystyka produktu leczniczego Medargin® .
127. Polski Lek S.A., Charakterystyka produktu leczniczego Vamea®.
128. L.F. Huang, F.Q. Guo, Y.Z. Liang, B.Y. Li, B.M. Cheng: Simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 380, 643-649, 2004.
129. H.Y. Aboul-Enein, M.M. Hefnawy, H. Hoenen: LC determination of the Enantiomeric purity of L-Arginine Using a Teicoplanin Chiral Stationary Phase. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 27 (11): 1681-1693, 2004.
130. P. Markowski, I. Baranowska, J. Baranowski: Simultaneous determination of L-arginine and 12 molecules participating in its metabolic cycle by gradient RP-HPLC method application to human urine samples. *Analytica Chimica Acta*, 605, 205-217, 2007.
131. J.Pawlaczyk, M.Zajac: Walidacja metod analizy chemicznej. Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań, 2005.
132. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005.
133. Stability testing of new drug substances and products Q1A (R2). ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2003.

IX. SPIS TABEL

Tabela 1	Spektrum działania przeciwbakteryjnego cefepimu	22
Tabela 2	Dawkowanie cefepimu u dorosłych i dzieci powyżej 40 kg przy prawidłowej czynności nerek w zależności od stanu zakażenia i drogi podania	24
Tabela 3.	Wielkość dawek preparatu Maxipime® inj. zarejestrowanego w Polsce.....	26
Tabela 4.	Trwałość i zgodność roztworów Maxipime inj. z innymi lekami i płynami do wlewów.....	27
Tabela 5	Wybrane metody instrumentalne do identyfikacji jakościowej i ilościowej cefepimu w matrycach różnego pochodzenia.....	28
Tabela 6.	Odczynniki i substancje pomocnicze zastosowane do badań.....	40
Tabela 7.	Aparatura i sprzęt użyty do badań.....	41
Tabela 8.	Składniki buforu cytrynianowego I, II oraz III.....	43
Tabela 9.	Właściwości fizykochemiczne buforów cytrynianowych I, II i III.....	43
Tabela 10.	Składniki 4% i 6% roztworów PVA.....	44
Tabela 11.	Właściwości fizykochemiczne 4% i 6% roztworów PVA.....	44
Tabela 12.	1% i 5% (w/w) roztwory wodne cefepimu oraz substancje pomocnicze zastosowane w badaniach zgodności farmaceutycznej.....	46
Tabela 13.	Skład recepturowych 1% i 5% kropli z zawartością cefepimu	49
Tabela 14.	Cel wykonania poszczególnych wersji recepturowych.....	52
Tabela 15.	Cechy organoleptyczne 1% i 5% (w/w) kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych.....	54
Tabela 16.	pH 1% i 5% (w/w) kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych przechowywanych przez 30 dni w temp. 4°C i 20°C.....	55
Tabela 17.	Ciśnienie osmotyczne 1% i 5% (w/w) kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych przechowywanych przez 30 dni w temp. 4°C i 20°C.....	58

Tabela 18.	Wyniki badań gęstości i lepkości kropli do oczu z 1% i 5 % (w/w) zawartością cefepimu w wersjach recepturowych o modyfikowanej lepkości.....	61
Tabela 19.	Parametry metody chromatograficznej.....	63
Tabela 20.	Równania regresji zastosowane do oznaczania stężenia cefepimu w poszczególnych wersjach 1% i 5% kropli recepturowych oraz kropli „przemysłowych”.....	64
Tabela 21.	Wyniki pomiarów dla kolejnych stężeń wzorca cefepimu dla równania $y=239414x-2982$	65
Tabela 22.	Wyniki pomiarów dla kolejnych stężeń wzorca cefepimu dla równania $y=246336x-3266,9$	66
Tabela 23.	Wyniki pomiarów dla kolejnych stężeń wzorca cefepimu dla równania $y=251095x-15221$	67
Tabela 24.	Wyniki pomiarów dla kolejnych stężeń wzorca cefepimu dla równania $y=245642x-2262,4$	68
Tabela 25.	Ocena statystyczna równań regresji sporządzonych do oznaczeń ilościowych cefepimu w 1% i 5% (w/w) kroplach recepturowych oraz kroplach przygotowanych na rozpuszczalniku do kropli wersji „przemysłowych”.....	69
Tabela 26.	Oznaczenie zawartości cefepimu w preparacie Maxipime®inj. seria 8E37309.....	70
Tabela 27.	Wyniki analizy dokładności metody ilościowego oznaczania cefepimu w mieszaninach modelowych 0,50%-0,75% (zakres 50%-75% dla kropli 1%).....	74
Tabela 28.	Wyniki analizy dokładności metody ilościowego oznaczania cefepimu w mieszaninach modelowych 0,8%-1,0% (zakres 80%-100% dla kropli 1%).....	75
Tabela 29.	Wyniki analizy dokładności metody ilościowego oznaczania cefepimu w mieszaninach modelowych 1,20% -1,25% (zakres 120%-125% dla kropli 1%).....	76
Tabela 30.	Wyniki analizy dokładności metody ilościowego oznaczania cefepimu w mieszaninach modelowych 2,5%-3,75% (zakres 50%-75% dla kropli 5%).....	77
Tabela 31.	Wyniki analizy dokładności metody ilościowego oznaczania cefepimu w mieszaninach modelowych 4,0%-5,0% (zakres 80%-100% dla kropli 5%).....	78

Tabela 32	Wyniki analizy dokładności metody ilościowego oznaczania cefepimu w mieszaninach modelowych 6,0% -6,25% (zakres 100%-125% dla kropli 5%).....	79
Tabela 33.	Wyniki analizy precyzji metody ilościowego oznaczania cefepimu w mieszaninach modelowych 0,5% -1,25% (dla kropli 1%).....	80
Tabela 34.	Wyniki analizy precyzji metody ilościowego oznaczania cefepimu w mieszaninach modelowych 2,5%-6,25% (dla kropli 5%).....	80
Tabela 35.	Równania regresji zastosowane w badaniach oraz odpowiadające im wartości LD i LQ.....	82
Tabela 36.	Wyniki analizy elastyczności ilościowej metody oznaczania cefepimu w roztworach wodnych i kroplach do oczu.....	83
Tabela 37.	Parametry rozdziału chromatograficznego wyznaczone dla cefepimu w 1 % i 5 % (w/w) kroplach wersji recepturowych: nr 4R i IVR oraz kroplach „przemysłowych” wersji 4P i IVP świeżo sporządzonych oraz podczas przechowywania w temperaturze 4°C	86
Tabela 38.	Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 1% roztworach wodnych (0 ₁ %) świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną.....	87
Tabela 39.	Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 1% recepturowych kroplach do oczu wersji nr 1R świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną.....	89
Tabela 40.	Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 1% recepturowych kroplach do oczu wersji nr 2R świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną.....	91
Tabela 41.	Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 1% recepturowych kroplach do oczu wersji nr 3R świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną.....	93
Tabela 42.	Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 1% recepturowych kroplach do oczu wersji nr 3aR świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną.....	95
Tabela 43.	Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 1% recepturowych kroplach do oczu wersji nr 4R świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną.....	97
Tabela 44.	Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 1% recepturowych kroplach do oczu wersji nr 4aR świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną.....	99

Tabela 45.	Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 5% roztworach wodnych (0 _{5%}) świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną.....	101
Tabela 46.	Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 5% recepturowych kroplach do oczu wersji nr IR świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną.....	103
Tabela 47.	Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 5% recepturowych kroplach do oczu wersji nr IaR świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną.....	105
Tabela 48.	Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 5% recepturowych kroplach do oczu wersji nr IIIR świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną.....	107
Tabela 49.	Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 5% recepturowych kroplach do oczu wersji nr IIIaR świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną.....	109
Tabela 50.	Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 5% recepturowych kroplach do oczu wersji nr IVR świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną.....	111
Tabela 51.	Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 5% recepturowych kroplach do oczu wersji nr IVaR świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną.....	113
Tabela 52.	Wyniki oznaczania zawartości cefepimu w 5% recepturowych kroplach do oczu wersji nr IVbR świeżo sporządzonych i przechowywanych przez 30 dni w temperaturze 4°C i 20°C, wraz z oceną statystyczną.....	115
Tabela 53.	Skład rozpuszczalników dla 1% i 5% kropli „przemysłowych” z cefepimem.....	117
Tabela 54.	Ocena fizyczna rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% (w/w) kropli przemysłowych z cefepimem świeżo sporządzonych oraz w czasie testu długoterminowego po 3 i 6 miesiącach w temp. 25°C ± 2°C i RH 60% ± 5% RH.....	120
Tabela 55.	Ocena fizyczna rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% (w/w) kropli przemysłowych z cefepimem świeżo sporządzonych oraz w czasie testu długoterminowego po 9 i 12 miesiącach w temp. 25°C ± 2°C i RH 60% ± 5% RH.....	121
Tabela 56.	Ocena fizyczna rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% (w/w) kropli przemysłowych z cefepimem świeżo sporządzonych oraz w czasie testu przyspieszonego po 3 i 6 miesiącach w temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH.....	122

Tabela 57.	Wymagania dla testu konserwacji wg FP VII dla preparatów do oczu - kryterium A.....	126
Tabela 58.	Wyniki testu konserwacji dla rozpuszczalników nr 2, nr 4 i nr IV przeznaczonych do sporządzania 1 % i 5% kropli „przemysłowych”, po 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 25 °C ± 2 °C /60 % RH ± 5% RH.....	126
Tabela 59.	Skład 1% i 5% kropli „przemysłowych” z wykorzystaniem rozpuszczalników świeżo sporządzonych oraz poddanych procesowi przyspieszonego starzenia.....	127
Tabela 60.	Zapach, barwa i przezroczystość 1% i 5% kropli „przemysłowych” przygotowanych przy użyciu rozpuszczalników świeżo sporządzonych (P0) oraz poddanych testowi przyspieszonego starzenia (P6) (6 miesięcy w temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH) przechowywanych w temp.4°C.	129
Tabela 61.	pH 1% i 5% kropli „przemysłowych” przechowywanych w temperaturze 4°C, przygotowanych przy użyciu rozpuszczalników świeżo sporządzonych (P0) oraz poddanych testowi przyspieszonego starzenia (P6) (6 miesięcy w temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH).....	130
Tabela 62.	Ciśnienie osmotyczne 1% i 5% kropli „przemysłowych” przechowywanych w temperaturze 4°C, przygotowanych na rozpuszczalnikach świeżo sporządzonych (P0) oraz poddanych testowi przyspieszonego starzenia (P6) (6 miesięcy w temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH).....	132
Tabela 63.	Gęstość i lepkość 1% i 5% kropli „przemysłowych” przechowywanych w temperaturze 4°C przygotowanych przy użyciu rozpuszczalników świeżo sporządzonych (P0) oraz poddanych testowi przyspieszonego starzenia (P6) (6 miesięcy w temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH).....	134
Tabela 64.	Wyniki badań zawartości cefepimu w 1% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (1P0) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika, wraz z oceną statystyczną.....	135
Tabela 65.	Wyniki badań zawartości cefepimu w 1% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (2P0) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika, wraz z oceną statystyczną.....	136
Tabela 66.	Wyniki badań zawartości cefepimu w 1% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (3P0) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika, wraz z oceną statystyczną.....	137

Tabela 67.	Wyniki badań zawartości cefepimu w 1% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (4P0) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika, wraz z oceną statystyczną.....	138
Tabela 68.	Wyniki badań zawartości cefepimu w 5% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (IP0) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika, wraz z oceną statystyczną.....	139
Tabela 69.	Wyniki badań zawartości cefepimu w 5% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (IIP0) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika, wraz z oceną statystyczną.....	140
Tabela 70.	Wyniki badań zawartości cefepimu w 5% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (IVP0) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika, wraz z oceną statystyczną.....	141
Tabela 71.	Wyniki badań zawartości cefepimu w 1% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (1P6) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu rozpuszczalnika przemysłowego poddanego testowi przyspieszonego starzenia, wraz z oceną statystyczną.....	142
Tabela 72.	Wyniki badań zawartości cefepimu w 1% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (2P6) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu rozpuszczalnika przemysłowego poddanego testowi przyspieszonego starzenia, wraz z oceną statystyczną.....	143
Tabela 73.	Wyniki badań zawartości cefepimu w 1% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (3P6) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu rozpuszczalnika przemysłowego poddanego testowi przyspieszonego starzenia, wraz z oceną statystyczną.....	144
Tabela 74.	Wyniki badań zawartości cefepimu w 1% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (4P6) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu rozpuszczalnika przemysłowego poddanego testowi przyspieszonego starzenia, wraz z oceną statystyczną.....	145
Tabela 75.	Wyniki badań zawartości cefepimu w 5% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (IP6) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu rozpuszczalnika przemysłowego poddanego testowi przyspieszonego starzenia, wraz z oceną statystyczną.....	146
Tabela 76.	Wyniki badań zawartości cefepimu w 5% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (IIP6) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu rozpuszczalnika przemysłowego poddanego testowi przyspieszonego starzenia, wraz z oceną statystyczną.....	147

Tabela 77.	Wyniki badań zawartości cefepimu w 5% kroplach do oczu w wersji „przemysłowej” (IVP6) przechowywanych w temp. 4°C, przygotowanych przy użyciu rozpuszczalnika przemysłowego poddanego testowi przyspieszonego starzenia, wraz z oceną statystyczną.....	148
Tabela 78.	Trwałość cefepimu w 1% i 5% kroplach „przemysłowych” przygotowanych przy zastosowaniu świeżo sporządzonych rozpuszczalników oraz rozpuszczalników poddanych procesowi przyspieszonego starzenia.....	149
Tabela 79.	Porównanie trwałości 1% i 5% recepturowych kropli do oczu cefepimem przechowywanych w temp. 4°C i 20°C przez 30 dni.....	158
Tabela 80.	Zmiany pH rozpuszczalników „przemysłowych” w czasie badań stabilności.....	164
Tabela 81.	Zmiany ciśnienia osmotycznego rozpuszczalników „przemysłowych” w czasie badań stabilności.....	164
Tabela 82.	Zmiany lepkości rozpuszczalników „przemysłowych” w czasie badań stabilności.....	165
Tabela 83.	Zestawienie wyników ciśnienia osmotycznego (mOsm/l) w 1% i w 5% kroplach do oczu z cefepimem wersji recepturowych (R), „przemysłowych”- przygotowanych na świeżo sporządzonych rozpuszczalnikach (P0), sporządzonych na rozpuszczalnikach poddanych testowi przyspieszonego starzenia (P6).....	167
Tabela 84.	Trwałość 1% i 5% roztworów wodnych cefepimu oraz kropli 1% i 5% recepturowych i „przemysłowych” wyrażona w dniach, w których utrzymywało się jeszcze 90% zawartość cefepimu w odniesieniu do zawartości początkowej.....	168

X. SPIS RYCIN

Rycina 1.	(A)PAA ₄₅₀ -CYS insert bezpośrednio po aplikacji (B) PAA ₄₅₀ -CYS insert 8 h po aplikacji.....	14
Rycina 2.	Porównanie wielkości insertu przed nawilżeniem (lewa strona ryciny) oraz po nawilżeniu (prawa strona ryciny).	14
Rycina 3.	Modyfikacje cząsteczki cefalosporyn	19
Rycina 4.	Struktura chemiczna chlorowodoru cefepimu.....	19
Rycina 5.	Schemat degradacji cefepimu w roztworze glukozy	33
Rycina 6.	N-metylopirolidyna - struktura chemiczna	34
Rycina 7.	Struktura L-argininy.....	37
Rycina 8.	pH 1% roztworów wodnych oraz 1% kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych podczas przechowywania przez 30 dni w temp. 4°C.....	56
Rycina 9.	pH 1% roztworów wodnych oraz 1% kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych podczas przechowywania przez 30 dni w temp. 20°C.....	56
Rycina 10.	pH 5% roztworów wodnych oraz 5% kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych podczas przechowywania przez 30 dni w temp. 4°C.....	57
Rycina 11.	pH 5% roztworów wodnych oraz 5% kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych podczas przechowywania przez 30 dni w temp. 20°C.....	57
Rycina 12.	Ciśnienie osmotyczne 1% roztworów wodnych oraz 1% kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych podczas przechowywania przez 30 dni w temp. 4°C.....	59
Rycina 13.	Ciśnienie osmotyczne 1% roztworów wodnych oraz 1% kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych podczas przechowywania przez 30 dni w temp. 20°C.....	59
Rycina 14.	Ciśnienie osmotyczne 5% roztworów wodnych oraz 5% kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych podczas przechowywania przez 30 dni w temp. 4°C.....	60
Rycina 15.	Ciśnienie osmotyczne 5 % roztworów wodnych oraz 5% kropli do oczu z cefepimem w wersjach recepturowych podczas przechowywania przez 30 dni w temp. 20°C.....	60

Rycina 16.	Chromatogram roztworu wodnego wzorca dichlorowodoru cefepimu (CRS).....	64
Rycina 17.	Wykres zależności pola powierzchni od stężenia cefepimu dla równania $y=239414x-2982$	65
Rycina 18.	Wykres zależności pola powierzchni od stężenia cefepimu dla równania $y=246336x-3266,9$	66
Rycina 19.	Wykres zależności pola powierzchni od stężenia cefepimu dla równania $y=251095x-15221$	67
Rycina 20.	Wykres zależności pola powierzchni od stężenia cefepimu dla równania $y=245642x-2262,4$	68
Rycina 21.	Chromatogram roztworu wodnego wzorca dichlorowodoru cefepimu(CRS).....	71
Rycina 22.	Chromatogram roztworu wodnego preparatu Maxipime®inj.....	72
Rycina 23.	Chromatogram kropli w wersji placebo o składzie jakościowym i ilościowym odpowiadającym wersji nr 4R kropli z 1 % cefepimem.....	72
Rycina 24.	Widmo UV-Vis dichlorowodoru cefepimu w zakresie długości fali 200 nm – 800 nm. Analityczna długość fali λ max = 257 nm.....	72
Rycina 25.	Widmo UV-Vis kropli placebo w zakresie długości fali 200 nm – 800 nm.....	73
Rycina 26.	Chromatogram świeżo sporządzonego 1% wodnego roztworu cefepimu (0 _{1%}).....	88
Rycina 27.	Chromatogram 1% wodnego roztworu cefepimu (0 _{1%}) po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	88
Rycina 28.	Chromatogram 1% wodnego roztworu cefepimu (0 _{1%}) po 30 dniach przechowywania w temp. 20°C.....	88
Rycina 29.	Chromatogram świeżo sporządzonych 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 1R.....	90
Rycina 30.	Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 1R po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	90
Rycina 31.	Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 1R po 30 dniach przechowywania w temp.20°C.....	90
Rycina 32.	Chromatogram świeżo sporządzonych 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 2R.....	92

Rycina 33.	Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 2R po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	92
Rycina 34.	Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 2R po 30 dniach przechowywania w temp.20°C.....	92
Rycina 35.	Chromatogram świeżo sporządzonych 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 3R.....	94
Rycina 36.	Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 3R po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	94
Rycina 37.	Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 3R po 30 dniach przechowywania w temp.20°C.....	94
Rycina 38.	Chromatogram świeżo sporządzonych 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 3aR.....	96
Rycina 39.	Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 3aR po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	96
Rycina 40.	Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 3aR po 30 dniach przechowywania w temp.20°C.....	96
Rycina 41.	Chromatogram świeżo sporządzonych 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 4R.....	98
Rycina 42.	Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 4R po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	98
Rycina 43.	Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 4R po 30 dniach przechowywania w temp.20°C.....	98
Rycina 44.	Chromatogram świeżo sporządzonych 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 4aR.....	100
Rycina 45.	Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 4aR po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	100
Rycina 46.	Chromatogram 1% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr 4aR po 30 dniach przechowywania w temp.20°C.....	100
Rycina 47.	Chromatogram świeżo sporządzonego 5% wodnego roztworu cefepimu (0 ₅ %).....	102
Rycina 48.	Chromatogram 5% wodnego roztworu cefepimu (0 ₅ %) po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	102
Rycina 49.	Chromatogram 5% wodnego roztworu cefepimu (0 ₅ %) po 30 dniach przechowywania w temp.20°C.....	102

Rycina 50.	Chromatogram świeżo sporządzonych 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IR.....	104
Rycina 51.	Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IR po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	104
Rycina 52.	Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IR po 30 dniach przechowywania w temp.20°C.....	104
Rycina 53.	Chromatogram świeżo sporządzonych 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IaR.....	106
Rycina 54.	Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IaR po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	106
Rycina 55.	Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IaR po 30 dniach przechowywania w temp.20°C.....	106
Rycina 56.	Chromatogram świeżo sporządzonych 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IIIR.....	108
Rycina 57.	Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IIIR po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	108
Rycina 58.	Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IIIR po 30 dniach przechowywania w temp.20°C.....	108
Rycina 59.	Chromatogram świeżo sporządzonych 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IIIaR.....	110
Rycina 60.	Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IIIaR po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	110
Rycina 61.	Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IIIaR po 30 dniach przechowywania w temp.20°C.....	110
Rycina 62.	Chromatogram świeżo sporządzonych 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IVR.....	112
Rycina 63.	Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IVR po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	112
Rycina 64.	Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IVR po 30 dniach przechowywania w temp.20°C.....	112
Rycina 65.	Chromatogram świeżo sporządzonych 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IVaR.....	114

Rycina 66.	Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IVaR po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	114
Rycina 67.	Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IVaR po 30 dniach przechowywania w temp.20°C.....	114
Rycina 68.	Chromatogram świeżo sporządzonych 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IVbR.....	116
Rycina 69.	Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IVbR po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	116
Rycina 70.	Chromatogram 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji nr IVbR po 30 dniach przechowywania w temp.20°C.....	116
Rycina 71.	Zmiany pH rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych” poddanych testowi długoterminowego starzenia w temp. 25°C ± 2°C i RH 60% ± 5% RH.....	123
Rycina 72.	Zmiany ciśnienia osmotycznego (mOsm/L) rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych” poddanych testowi długoterminowego starzenia w temp. 25°C ± 2°C i RH 60% ± 5% RH.....	123
Rycina 73.	Zmiany lepkości (mPa·s) rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych” poddanych testowi długoterminowego starzenia w temp. 25°C ± 2°C i RH 60% ± 5% RH.....	123
Rycina 74.	Zmiany pH rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych” poddanych testowi przyspieszonego starzenia w temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH.....	124
Rycina 75.	Zmiany ciśnienia osmotycznego (mOsm/L) rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych” poddanych testowi przyspieszonego starzenia w temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH.....	124
Rycina 76.	Zmiany lepkości (mPa·s) rozpuszczalników przeznaczonych do 1% i 5% kropli „przemysłowych” poddanych testowi przyspieszonego starzenia w temp. 40°C ± 2°C i RH 75% ± 5% RH.....	124
Rycina 77.	pH 1% i 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji „przemysłowej” przygotowanych z zastosowaniem rozpuszczalników świeżo sporządzonych. Krople przechowywano przez 30 dni w temp. 4°C.....	131
Rycina 78.	pH 1% i 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji „przemysłowej” przygotowanych z zastosowaniem rozpuszczalników poddanych procesowi przyspieszonego starzenia (6 m-cy, temp. 40°C ± 2°C RH 75% ± 5% RH). Krople przechowywano przez 30 dni w temp.4°C.....	131

Rycina 79.	Ciśnienie osmotyczne 1% i 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji „przemysłowej” przygotowanych z zastosowaniem rozpuszczalników świeżo sporządzonych. Krople przechowywano przez 30 dni w temp. 4°C.	133
Rycina 80.	Ciśnienie osmotyczne 1% i 5% kropli do oczu z cefepimem w wersji „przemysłowej” przygotowanych z zastosowaniem rozpuszczalników poddanych procesowi przyspieszonego starzenia (6 m-cy, temp. 40°C± 2°C i RH 75% ± 5% RH). Krople przechowywano przez 30 dni w temp. 4°C.....	133
Rycina 81.	Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 1P0 bezpośrednio po przygotowaniu przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika.....	135
Rycina 82.	Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 1P0 po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	135
Rycina 83.	Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 2P0 bezpośrednio po przygotowaniu przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika.....	136
Rycina 84.	Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 2P0 po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	136
Rycina 85.	Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 3P0 bezpośrednio po przygotowaniu przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika.....	137
Rycina 86.	Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 3P0 po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	137
Rycina 87.	Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 4P0 bezpośrednio po przygotowaniu przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika....	138
Rycina 88.	Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 4P0 po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	138
Rycina 89.	Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IP0 bezpośrednio po przygotowaniu przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika.....	139
Rycina 90.	Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IP0 po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	139
Rycina 91.	Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IIIP0 bezpośrednio po przygotowaniu przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika.....	140
Rycina 92.	Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IIIP0 po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	140
Rycina 93.	Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IVP0 bezpośrednio po przygotowaniu przy użyciu świeżo sporządzonego rozpuszczalnika.....	141

Rycina 94.	Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IVP0 po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C.....	141
Rycina 95.	Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 1P6 bezpośrednio po przygotowaniu na rozpuszczalniku poddanemu testowi przyspieszonego starzenia.....	142
Rycina 96.	Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 1P6 po 30 dniach przechowywania w temp. 4°C.....	142
Rycina 97.	Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 2P6 bezpośrednio po przygotowaniu na rozpuszczalniku poddanemu testowi przyspieszonego starzenia.....	143
Rycina 98.	Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 2P6 po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	143
Rycina 99.	Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 3P6 bezpośrednio po przygotowaniu na rozpuszczalniku poddanemu testowi przyspieszonego starzenia.....	144
Rycina 100	Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 3P6 po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	144
Rycina 101	Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 4P6 bezpośrednio po przygotowaniu na rozpuszczalniku poddanemu testowi przyspieszonego starzenia.....	145
Rycina 102.	Chromatogram 1% kropli do oczu w wersji 4P6 po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	145
Rycina 103.	Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IP6 bezpośrednio po przygotowaniu na rozpuszczalniku poddanemu testowi przyspieszonego starzenia.....	146
Rycina 104.	Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IP6 po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	146
Rycina 105.	Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IIP6 bezpośrednio po przygotowaniu na rozpuszczalniku poddanemu testowi przyspieszonego starzenia.....	147
Rycina 106.	Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IIP6 po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	147
Rycina 107.	Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IVP6 bezpośrednio po przygotowaniu na rozpuszczalniku poddanemu testowi przyspieszonego starzenia.....	148

Rycina 108.	Chromatogram 5% kropli do oczu w wersji IVP6 po 30 dniach przechowywania w temp.4°C.....	148
Rycina 109.	Przykładowe chromatogramy 1% buforowanych kropli do oczu z cefepimem w wersji 1R po sporządzeniu (A), po 30 dniach przechowywania w temp.4°C (B) oraz po 30 dniach przechowywania w temp.20°C (C).....	150
Rycina 110.	Widmo w UV-Vis cefepimu ($t_R = 10,884$ min.) zawartego w 1% kroplach świeżo sporządzonych wersji recepturowej 1R (A). Widmo absorpcji produktu rozpadu cefepimu ($t_R = 4,16$ min.) stwierdzonego w kropalch po 30 dniach przechowywania w temp.20°C (B).....	151