



Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Piotr Garbacki

**Wpływ sterylizacji radiacyjnej na trwałość wybranych
cefalosporyn**

Rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych

Promotor: prof. zw. dr hab. Anna Jelińska

Praca powstała dzięki wsparciu Naukowej Fundacji Polpharmy

Poznań 2015

Słowa kluczowe: cefalosporyny,
sterylizacja radiacyjna,
promieniowanie,
trwałość leku.

Składam serdeczne podziękowania

Pani prof. dr hab. Annie Jelińskiej,

za umożliwienie wykonania pracy doktorskiej,

kierownictwo naukowe,

za cierpliwość, poświęcony czas

oraz pomoc w prowadzeniu badań i opracowaniu wyników

Pani dr hab. Judycie Cieleckiej-Piontek,

za cenne wskazówki, okazaną pomoc i ogromną życzliwość

Panu prof. UAM dr hab. Maciejowi Kozakowi,

Panu dr hab. Waldemarowi Bednarskiemu,

Pani dr inż. Kornelii Lewandowskiej,

Pani mgr anal. med. Magdalenie Ratajczak,

za okazaną pomoc w prowadzeniu badań.

Pani prof. dr hab. Irenie Oszczapowicz

za udostępnienie substancji do badań

Firmie Mettler Toledo,

za udostępnienie różnicowego kalorymetru skaningowego

Koleżankom i Kolegom

z Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej

za miłą atmosferę w trakcie badań oraz wszelką pomoc

Dziękuję również moim Rodzicom oraz Przyjaciołom za wiarę

i wsparcie

SPIS TREŚCI

1. Wstęp	6
2. Część teoretyczna.....	13
2.1. Historia odkrycia antybiotyków cefalosporynowych.....	13
2.2. Budowa chemiczna i podział cefalosporyn	14
2.2.1. Budowa cefalosporyn	14
2.2.2. Podział cefalosporyn.....	16
2.3. Mechanizm działania cefalosporyn	25
2.4. Działania niepożądane cefalosporyn	26
2.5. Charakterystyka wybranych antybiotyków cefalosporynowych.....	28
2.5.1. Ceftiofur sodowy	28
2.5.2. Siarczan cefkwinomu.....	30
2.5.3. Cefuroksym aksetylu	31
2.5.4. Siarczan cefoseliny	33
2.5.5. Dichlorowodorek cefepimu jednowodny.....	35
2.5.6. Chlorowodorek cefetametetu piwoksylu	37
3. Cel pracy.....	39
4. Część doświadczalna	41
4.1. Materiał do badań	41
4.2. Odczynniki i substancje wzorcowe	42
4.3. Aparatura i sprzęt pomiarowy	43
4.4. Metodyka badań	44
4.4.1. Przygotowanie próbek	44
4.4.2. Napromieniowanie.....	45
4.4.3. Analiza wagowa.....	45
4.4.4. Analiza organoleptyczna.....	45
4.5. Metody badań	45
4.5.1. Spektrometria elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR)	45
4.5.2. Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR).....	46
4.5.3. Spektroskopia Ramana	46
4.5.4. Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC).....	46
4.5.5. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)	46
4.5.6. Proszkowa dyfraktometria rentgenowska (XRPD).....	47

4.5.7. Badania mikrobiologiczne	47
4.5.8. Badania chromatograficzne (HPLC i UHPLC)	49
5. Wyniki	55
5.1. Analiza wagowa	55
5.2. Analiza organoleptyczna	57
5.3. Spektrometria elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR)	59
5.4. Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR)	60
5.5. Spektroskopia Ramana	68
5.6. Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)	76
5.7. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM).....	81
5.8. Proszkowa dyfraktometria rentgenowska (XRPD)	83
5.9. Badania mikrobiologiczne.....	86
5.10. Analiza chromatograficzna (HPLC i UHPLC).....	87
5.10.1. Wyniki walidacji/rewalidacji metod chromatograficznych	87
5.10.2. Ocena zmian stężenia badanych cefalosporyn pod wpływem promieniowania jonizującego	98
5.10.3. Wyznaczanie parametrów kinetycznych rozkładu wybranych cefalosporyn po ekspozycji na promieniowanie jonizujące.....	100
6. Omówienie wyników	101
7. Wnioski.....	119
8. Streszczenie	120
9. Summary	123
10. Piśmiennictwo	126

1. Wstęp

Zapewnienie odpowiedniej jakości leku jest kluczowym warunkiem skutecznej i bezpiecznej farmakoterapii. Z pojęciem jakości substancji leczniczej nierozdzielnie wiąże się jej trwałość. Na trwałość leku może wpływać wiele czynników, zarówno na etapie syntezy (zastosowane rozpuszczalniki, kolejność dodawania poszczególnych składników), jak również w procesie przygotowania formułacji farmaceutycznych oraz w trakcie ich przechowywania (podwyższona wilgotność i temperatura, pH roztworu). Dodatkowym wymogiem, zawartym w Farmakopei Europejskiej 8.0 oraz w Farmakopei Polskiej X jest konieczność spełniania kryterium jałowości dla leków stosowanych pozajelitowo, leków ocznych, leków stosowanych na rozległe rany i oparzenia, jak również w procesie przygotowania preparatów zawierających antybiotyki. Ma to kluczowe znaczenie, zwłaszcza w leczeniu chorób o etiologii bakteryjnej. Jałowość (sterylność) można określić jako nieobecność w danym materiale drobnoustrojów (bakterii, grzybów, pierwotniaków i wirusów) oraz ich form przetrwalnikowych. W celu otrzymania jałowego produktu farmaceutycznego należy go poddać procesowi sterylizacji. Należy jednak pamiętać, że nawet najlepiej przeprowadzona sterylizacja nie doprowadzi do osiągnięcia całkowitej, stuprocentowej jałowości. Spowodowane jest tym, iż zmniejszanie liczby drobnoustrojów zachodzi w sposób wykładniczy i nigdy nie osiągnie poziomu zerowego. Aby umożliwić określenie jałowości danego materiału wprowadzono współczynnik zapewnienia sterylności SAL (*Stearity Assurance Level*). Zgodnie z wytycznymi farmakopealnymi można przyjąć, że jałowy jest lek, dla którego $SAL \leq 10^{-6}$, tzn. na milion bakterii przed procesem sterylizacyjnym zachowała się jedna o ograniczonej zdolności rozwojowej [1,2].

Dobór odpowiedniej metody sterylizacji jest uwarunkowany przede wszystkim rodzajem materiału, który ma być wyjaławiany, tak aby nie został on zniszczony lub uszkodzony. Pod uwagę bierze się również koszt tego procesu oraz czas niezbędny do uzyskania jałowego produktu. W zależności od rodzaju czynnika wyjaławiającego można wyróżnić następujące metody sterylizacji [2,3]:

❖ fizyczne

- za pomocą zimnej plazmy,
- za pomocą promieniowania,

-
- jonizującego,
 - nadfioletowego,
 - sterylizacja termiczna
 - wyżarzenie i spalanie,
 - wyjaławianie suchym gorącym powietrzem,
 - wyjaławianie nasyconą parą wodną pod zwiększonym ciśnieniem,
 - wyjaławianie przez ogrzewanie z dodatkiem substancji przeciwbakteryjnej,
 - ❖ chemiczne
 - za pomocą gazowego formaldehydu i tlenku etylenu,
 - za pomocą roztworów aldehydu glutarowego i kwasu nadoctowego,
 - ❖ mechaniczne
 - sączenie filtracyjne gazów i cieczy,
 - sterylizacja wysokim ciśnieniem.

Stosownie do wytycznych Europejskiej Agencji ds. Oceny Środków Leczniczych (EMA - *European Agency for the Evaluate of Medicinal Products*) metodą, która gwarantuje jałowość leków jest sterylizacja termiczna. Biorąc pod uwagę rodzaj wyjaławianej formulacji stosuje się odpowiednio: parę wodną pod ciśnieniem w temperaturze 121°C przez 15 minut (dla roztworów wodnych) lub suche gorące powietrze w temperaturze 160°C przez 160 minut (preparaty niewodne, półwodne i stałe). Niektóre substancje lecznicze, pomocnicze oraz postacie leku wykazują labilność w warunkach podwyższonej wilgotności i temperatury. W takim przypadku niezbędne jest zastosowanie innej metody wyjaławiania [3]. Zgodnie z wytycznymi EMA (CPMP/QWP/054/98) można wykorzystać:

- nasyconą parą wodną w temperaturze 121°C przez 8 minut, jeżeli zostanie zapewniony poziom $SAL \leq 10^{-6}$,
- suche gorące powietrze w innych warunkach temperaturowych i czasowych, jeżeli zostanie zapewniony poziom $SAL \leq 10^{-6}$,
- sterylizację radiacyjną,
- sterylizację sączeniową,
- aseptyczny proces wytwarzania lub połączenie dwóch metod.

Do 2001 roku powszechną metodą wyjaławiania materiałów termolabilnych było wykorzystanie tlenu etylenu. Wykazano jednak, że jest on niezwykle reaktywny, oddziałuje ze składnikami tworzącymi struktury komórkowe (kwasy nukleinowe, białka), przez co może wykazywać cytotoksyczność, mutagenność i kancerogenność. Obecnie dopuszcza się zastosowanie tlenu etylenu jedynie wtedy kiedy nie jest dostępna inna metoda i gdy jego pozostałość w wyjaławianym produkcie nie przekracza 1 ppm [3].

Wobec ograniczenia stosowania tlenu etylenu konieczne stało się poszukiwanie i zwalidowanie alternatywnych, niskotemperaturowych metod sterylizacyjnych. Wykazano skuteczność dwóch metod: sączenia przez sącziki membranowe o odpowiedniej średnicy porów oraz radiacyjnej. Metoda sączeniowa może być wykorzystana wyłącznie dla leków w postaci roztworów. Ponadto, w skali przemysłowej cechuje się ona niską wydajnością i wysokimi kosztami. Wobec powyższych ograniczeń metodą z wyboru przy wyjaławianiu termolabilnych materiałów (substancji leczniczych, formulacji farmaceutycznych i wyrobów medycznych) jest zastosowanie promieniowania jonizującego.

Podstawą sterylizacji radiacyjnej jest wykorzystanie promieniowania gamma, beta lub wiązki wysokoenergetycznych elektronów z akceleratora. Promieniowanie uszkadza materiał genetyczny oraz białka drobnoustrojów, doprowadzając w rezultacie do zahamowania ich aktywności życiowej i śmierci. Wyróżnić można dwa mechanizmy oddziaływania promieniowania na komórki mikroorganizmów: bezpośredni i pośredni. Bezpośredni mechanizm polega na wybiciu elektronów z makrocząstek komórkowych i powstaniu wolnych rodników. Pośrednio powstają natomiast wysoce reaktywne produkty radiolizy wody, które zapoczątkowują reakcje prowadzące do śmierci komórki [4].

Fundamentem, który dał podstawy do dalszych prac w dziedzinie sterylizacji radiacyjnej było odkrycie w 1895 roku promieni X przez Roentgena. Odkrycie promieniotwórczości w 1896 roku oraz elektronu w 1897 roku, stały się kolejnymi kamieniami milowymi zwiastującymi początek okresu zwanego „złotym wiekiem” fizyki [5].

Prekursorką radiacyjnej metody wyjaławiania była Maria Skłodowska-Curie. Uczona spostrzegła, że woda obecna w roztworach radu pod wpływem promieniowania α rozpada się na tlen i wodór. Proces ten, przez analogię do elektrolizy, został nazwany radiolizą. W 1929 roku Maria Skłodowska-Curie w biuletynie francuskiej Akademii Nauk przedstawiła artykuł

pt. *“Sur l'étude des courbes de probabilité relatives à l'action des rayons X sur les bacilles”*, w którym zaprezentowała wyniki badań na temat wpływu promieniowania rentgenowskiego na bakterie. Była to pierwsza praca na temat sterylizacji radiacyjnej. Curie zwracała uwagę na możliwość biobójczego działania promieniowania. Uczona przedstawiła także ilościową zależność między dawką promieniowania a przeżyciem bakterii [6]:

$$N = N_0 e^{-kD}$$

gdzie:

N - liczba bakterii, które przetrwały naświetlanie

N_0 - początkowa liczba bakterii

D - dawka promieniowania

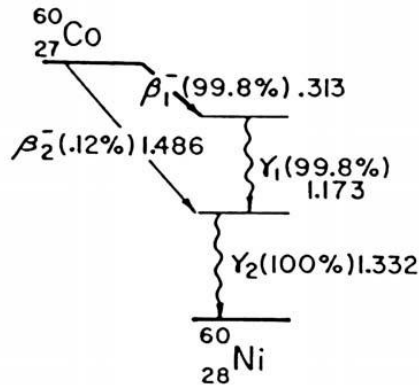
k - odporność bakterii

W kolejnych latach, wraz z wprowadzeniem i upowszechnieniem się jednorazowego sprzętu medycznego idea wykorzystania sterylizacji radiacyjnej zyskała na znaczeniu. W tym czasie opracowano szereg usprawnień, które w późniejszym okresie umożliwiły zastosowanie wyjaławiania za pomocą promieniowania na skalę przemysłową. Na uwagę zasługują prace Van de Graaffa, Alvareza i Charlesa Artandi. Uczeni poszukiwali zarówno nowych rozwiązań technologicznych, jak również źródeł promieniowania [5].

Jako źródła promieniowania stosuje się głównie radioizotopy oraz w mniejszym stopniu akceleratory elektronów. Niezwykle istotnym wydarzeniem w opracowaniu metod pozwalających na uzyskiwanie izotopów promieniotwórczych było skonstruowanie przez Ernesta O. Lawrence w 1931 roku pierwszego cyklotronu. Komora próżniowa mierzyła 11,5 cm i osiągnęto w niej przyspieszenie protonów rzędu 80000 eV. W kolejnych latach konstrukcja cyklotronów była udoskonalana, dzięki czemu możliwe było uzyskiwanie większych przyspieszeń protonów i otrzymywanie radioizotopów. W 1939 roku Ernest O. Lawrence otrzymał za swoje prace nagrodę Nobla w dziedzinie fizyki [7].

Najczęściej w procesie wyjaławiania stosuje się promieniowanie γ , którego źródłem jest ^{60}Co i ^{137}Cs . Izotopy te charakteryzują się wysoką energią promieniowania i posiadają długi okres półtrwania. Zastosowanie ^{137}Cs zostało jednak ograniczone. Izotop ^{60}Co ulega rozpadowi do

stabilnego izotopu niklu (^{60}Ni), z emisją ujemnej cząsteczki β . Powstały nikiel występuje w stanie wzbudzonym, emituje dwa fotony i w ten sposób osiąga stan stabilizacji (Rycina 1).



Ryc. 1. Schemat rozpadu radionuklidu ^{60}Co [7].

Obecnie wyjaławianie za pomocą promieniowania jest powszechnie stosowane zarówno przy produkcji leków i wyrobów medycznych, jak również w innych gałęziach przemysłu.

Jednostką powszechnie używaną w sterylizacji radiacyjnej do określania dawki pochłoniętej jest grej (Gy). Jest on równy absorpcji energii jednego dżula (J) przez masę 1 kilograma materii. Zazwyczaj do wyjaławiania stosuje się promieniowanie w dawkach 25000 Gy (25 kGy) do 50000 Gy (50 kGy) [8,9,10].

Obowiązujące obecnie normy dotyczące sterylizacji radiacyjnej zawarte są w dwóch dokumentach:

- Norma Europejska EN 552 - dopuszcza ona wykorzystanie promieniowania gamma (γ) oraz wiązki wysokoenergetycznych elektronów z akceleratora (e-beam) o energii ≤ 10 MeV w dawce minimalnej 25 kGy, która zapewnia $\text{SAL} \leq 10^{-6}$ [11],
- Norma Międzynarodowa ANSI/AAMI/ISO 11137:2006 - dopuszcza ona zastosowanie promieniowania gamma (γ), wiązki wysokoenergetycznych elektronów z akceleratora (e-beam) oraz promieniowania X w różnych dawkach, w zależności od rodzaju i poziomu wyjściowego zanieczyszczenia mikrobiologicznego oraz od docelowego poziomu zapewnienia jałowości [12].

Sterylizacja radiacyjna posiada liczne zalety, co przyczynia się do wzrostu powszechności jej stosowania w Europie i na świecie [13,14]. Należą do nich głównie:

-
- możliwość przeprowadzenia procesu w dowolnej temperaturze,
 - niezawodność i oddziaływanie na wszystkie rodzaje drobnoustrojów,
 - szybkość procesu,
 - powtarzalność procesu,
 - łatwość penetracji głębinowej,
 - brak pozostałości po napromieniowaniu,
 - możliwość sterylizacji w dowolnym opakowaniu,
 - zmniejszenie ryzyka wtórnej kontaminacji produktu,
 - łatwość monitorowania i kontrolowania procesu,
 - małe ryzyko wtórnej kontaminacji produktu.

Głównym ograniczeniem sterylizacji radiacyjnej jest możliwość uszkodzenia fizycznego lub chemicznego wyjąławanego materiału. Do najczęstszych zmian zachodzących pod wpływem promieniowania należy powstawanie wolnych rodników, które mogą inicjować reakcje łańcuchowe, prowadzące do trwałych produktów rozkładu, w tym izomerów optycznych czy strukturalnych. Na zmiany te szczególnie podatne są wodne roztwory leków, gdyż powstające produkty radiolizy wody (m.in. H_2O^+ , $\cdot\text{OH}$, H_3O^+ , $\text{H}\cdot$, H_2 , e^- , e^-_{eq}) przyspieszają rozkład substancji leczniczych. Preferuje się zatem sterylizację radiacyjną leków w stanie stałym [15-18]. Do najczęściej zachodzących pod wpływem promieniowania zmian w tym stanie skupienia zalicza się: zmianę zabarwienia, powstawanie defektów w sieci krystalicznej, zmianę postaci polimorficznej, zmianę skręcalności optycznej, obniżenie temperatury topnienia, powstanie produktów radiolizy (w tym wolnych rodników). Zmiany właściwości fizykochemicznych mogą przekładać się niekorzystnie na aktywność farmakologiczną oraz toksyczność leku. Charakter obserwowanych zmian uzależniony jest od struktury wyjąławanego materiału, postaci farmaceutycznej, zaabsorbowanej dawki i rodzaju promieniowania [9,15,16,18]. W tabeli 1 zestawiono przykładowe zmiany zachodzące w lekach sterylizowanych radiacyjnie.

Tabela 1. Przykłady zmian obserwowanych w lekach sterylizowanych radiacyjnie

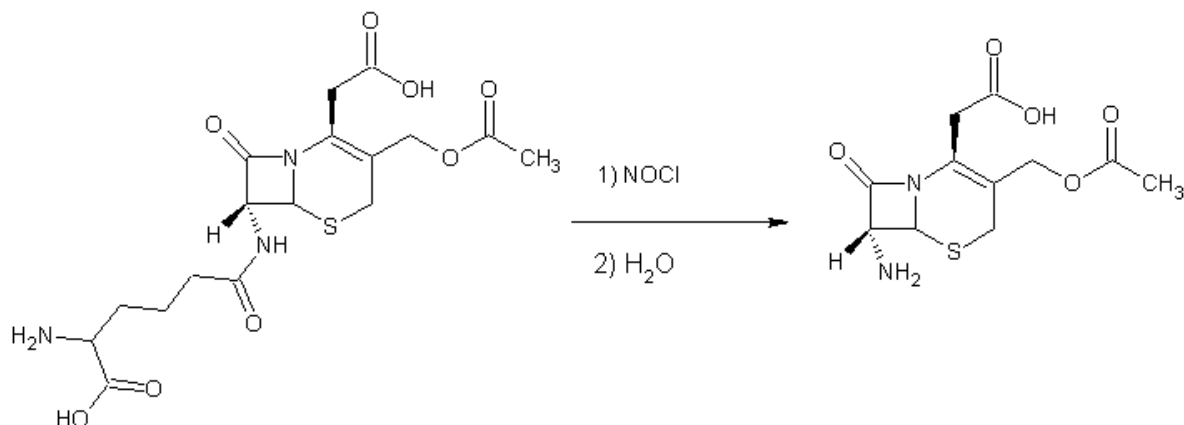
Obserwowane zmiany	Substancja lecznicza	Piśmiennictwo
Degradacja pierścienia β -laktamowego, utrata wody krystalizacyjnej, spadek aktywności mikrobiologicznej	cefiksym	[19]
Powstawanie wolnych rodników	sulbaktam sodowy	[20]
	cefoperazon	[21]
	cefotetan	[22]
Zmiana zabarwienia	cefpodoksym proksetylu, norfloksacyna, gatifloksacyna, sparfloksacyna	[23]
Obniżenie temperatury topnienia	ketoprofen	[24]
	kodeina, pilokarpina	[25]
Utlenienie	ketoprofen	[24]
Racemizacja	alanina	[26]

Wobec ograniczeń sterylizacji radiacyjnej konieczne jest przeprowadzenie badań trwałości dla każdego leku poddanego działaniu promieniowania. W tym celu należy poddać lek działaniu promieniowania w standardowej dawce 25 kGy [1,2,11], określić czy osiągnięty został zamierzony poziom czystości mikrobiologicznej, a następnie za pomocą odpowiednich metod analitycznych porównać jego właściwości fizykochemiczne z lekiem nienapromieniowanym. Działanie takie pozwala ocenić tak zwaną trwałość radiochemiczną leku. W przypadku antybiotyków przeprowadza się także badanie aktywności mikrobiologicznej, gdyż powstające pod wpływem promieniowania produkty rozkładu nie wykazują działania farmakologicznego, a ponadto mogą być przyczyną działań niepożądanych [19]. W badaniach trwałości leków sterylizowanych radiacyjnie oprócz standardowej dawki 25 kGy, wykorzystuje się również znacznie wyższe dawki promieniowania [11, 24,27-31]. Dzięki takiemu działaniu intensyfikacji ulegają wszystkie zmiany zachodzące w leku, co umożliwia identyfikację produktów jego rozkładu oraz określenie mechanizmu zachodzących przemian.

2. Część teoretyczna

2.1. Historia odkrycia antybiotyków cefalosporynowych [32-35]

Infekcje bakteryjne towarzyszyły ludzkości od zarania dziejów. Wobec nieznajomości etiologii chorób zakaźnych, nieświadomości istnienia patogenów oraz braku skutecznych metod leczenia, wielkie epidemie dziesiątkowały ludność Europy i świata. Czynnikiem sprzyjającym rozprzestrzenianiu się patogenów były też liczne wojny toczące się na przestrzeni wieków oraz fatalne warunki sanitarne. Kamieniem milowym w historii walki z infekcjami wywołanymi przez drobnoustroje było skonstruowanie pierwszych mikroskopów przez Roberta Hookea i Antoniego van Leeuwenhoeką w XVII wieku. W XIX i XX wieku dokonano szeregu odkryć w dziedzinach chemii organicznej, mikrobiologii, fizjologii i patofizjologii. Korzystając ze zdobyczy tych nauk opracowano wiele substancji, które mogą być wykorzystane w leczeniu chorób zakaźnych. Przełomem w walce z drobnoustrojami było odkrycie pierwszego antybiotyku – penicyliny przez Fleminga w 1928 roku, za co w 1945 roku został uhonorowany nagrodą Nobla. W tym samym roku włoski mikrobiolog Giuseppe Brotzu odkrył szczep grzyba, który hamował rozwój *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* B, *Yersinia pestis*, *Brucella melitensis*, *Vibrio cholerae* i *Staphylococcus aureus*. Działanie pierwszej cefalosporyny (od nazwy grzyba *Cephalosporinum acremonium*) było jednak stosunkowo słabe i nie wiązano wielkich nadziei z tym lekiem. W 1948 roku dzięki współpracy Brotzu z uczonymi brytyjskimi wyizolowano cefalosporynę P - pierwszą substancję, która mogła być wyodrębniona w rozpuszczalniku organicznym, podobnie jak penicylina. Była ona jednak aktywna tylko w stosunku do niektórych bakterii Gram-dodatnich i nie wyjaśniała działania klinicznego opisanego przez Brotza. W kolejnych latach udało się wyizolować cefalosporynę N (przemianowaną potem na penicylinę N) oraz cefalosporynę C. W 1961 roku odkryto strukturę chemiczną cefalosporyn i stwierdzono, że jest ona podobna do budowy penicylin. Obecnie cefalosporyny otrzymywane są na drodze chemicznej modyfikacji kwasu 7-aminocefalosporanowego. Związek ten pozyskuje się działając na cefalosporynę C chlorkiem nitrozyłu co prowadzi do uzyskania iminolaktonu, który następnie hydrolizuje do kwasu 7-aminocefalosporanowego (Rycina 2).



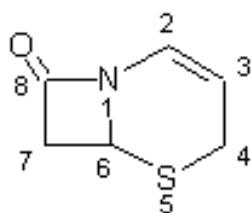
Ryc. 2. Schemat przemiany cefalosporyny C do kwasu 7-aminocefalosporanowego.

W 1962 roku do lecznictwa wprowadzono pierwszy antybiotyk z grupy cefalosporyn-cefalorydynę. Lek ten charakteryzował się dużą nefrotoksycnością, dlatego nie jest obecnie stosowany.

2.2. Budowa chemiczna i podział cefalosporyn [36, 37]

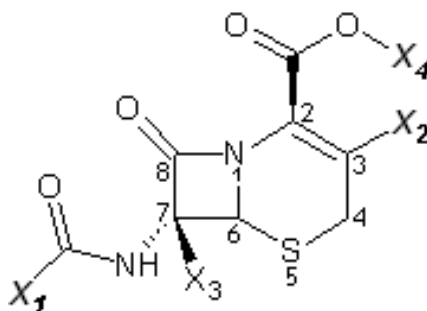
2.2.1. Budowa cefalosporyn

Cefalosporyny, podobnie jak penicyliny, zawierają czteroczłonowy układ β -laktamowy. Elementem charakterystycznym cefalosporyn jest sześcioczłonowy układ dihydrotiazynowy, odróżniający je od penicylin, które posiadają pięcioczłonowy układ tiazolidynowy. Cefalosporyny są pochodnymi Δ_2 -cefemu (Rycina 3) - układ ten jest połączeniem β -laktamowo-tiazynowym (4-członowy pierścień β -laktamowy połączony z 6-członowym pierścieniem dihydrotiazynowym). Ogólny wzór pochodnych cefemu został przedstawiony na rycinie 4.



Ryc. 3. Δ_2 -cefem (4-tia-1-azabicyklo-[4.2.0.]-oktan-8-on).

Najistotniejszym dla aktywności bakteriobójczej elementem budowy chemicznej cefalosporyn jest wiązanie β -laktamowe. Wiązanie to podatne jest na rozkład pod wpływem czynników fizykochemicznych (podwyższona temperatura, wilgotność względna powietrza, obecność kwasów i zasad, czynniki utleniające) oraz β -laktamaz. Produkty rozkładu są nieaktywne farmakologicznie, mogą być też przyczyną działań niepożądanych i wykazywać działanie toksyczne. Poprzez dobór odpowiednich podstawników otrzymano liczne pochodne cefalosporyn. W lecznictwie wykorzystuje się wyłącznie cefalosporyny półsyntetyczne.



Ryc. 4. Ogólny wzór pochodnych cefemu.

Budowa chemiczna cefalosporyn ma wpływ na ich aktywność, trwałość i biodostępność. Wykazano kluczowe znaczenie następujących podstawników oraz wiązań chemicznych:

- podstawnik X_1 w pozycji C7 odpowiedzialny jest za działanie bakteriobójcze, a także warunkuje spektrum działania i oporność na działanie β -laktamaz,
- podstawnik X_2 w pozycji C3 wpływa na farmakokinetykę oraz trwałość metaboliczną,
- podstawnik X_3 (grupa $-\text{OCH}_3$) chroni wiązanie β -laktamowe przed działaniem β -laktamaz,
- podstawnik X_4 zwiększa lipofilowość związku, co skutkuje poprawą biodostępności leku, estry odpowiednich cefalosporyn stanowią pro-leki,
- podwójne wiązanie między C2 i C3 wraz z podstawnikiem X_2 indukuje wiązanie β -laktamowe.

Do cefalosporyn zalicza się również:

- karbacefemy – w pozycji C5 posiadają atom węgla,
- oksacefemy – w pozycji C5 posiadają atom tlenu.

2.2.2. Podział cefalosporyn [36-43]

Cefalosporyny są bardzo liczną grupą leków i dlatego zostały podzielone na 5 generacji. Jako kryteria podziału przyjęto:

- zakres aktywności bakteriobójczej w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, szczepów należących do rodzajów *Pseudomonas*, *Proteus* oraz beztlenowców Gram-ujemnych typu *Bacteroides*,
- oporność na działanie β -laktamaz,
- stopień przenikania do płynu mózgowo-rdzeniowego.

Antybiotyki cefalosporynowe są powszechnie stosowane w farmakoterapii licznych infekcji o etiologii bakteryjnej (np. infekcje tkanek miękkich, zapalenie opon mózgowych, zapalenie płuc). Posiadają one szerokie spektrum aktywności przeciwbakteryjnej, a ponadto cechują się niską toksycznością. W celu zapewnienia racjonalnego wykorzystania cefalosporyn konieczna jest znajomość różnic pomiędzy poszczególnymi generacjami tej grupy leków.

2.2.2.1. I generacja

Antybiotyki należące do I generacji cefalosporyn (Tabela 2) charakteryzują się dużą aktywnością bakteriobójczą w stosunku do bakterii Gram-dodatnich. Ich działanie na szczepy Gram-ujemne jest stosunkowo słabe. Cefalosporyny I generacji są również nieskuteczne w leczeniu zakażeń wywołanych przez: enterokoki, metycylinooporny *S. aureus*, a także *S. epidermidis*.

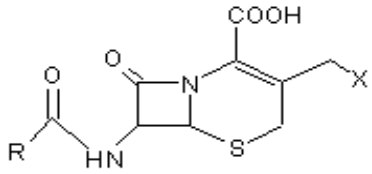
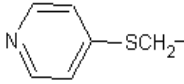
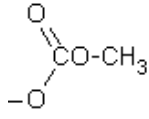
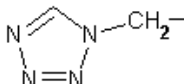
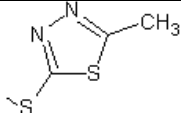
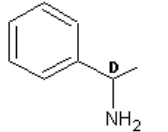
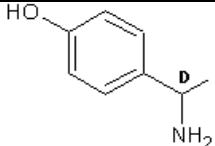
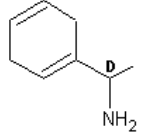
Do I generacji cefalosporyn zaliczyć można:

- cefalotyne,
- cefapiryne,
- cefazolinę,
- cefacetryl,
- cefaleksyne,
- cefradyne,
- cefadroksyl,
- cefalorydyne.

Aktywność tej generacji cefalosporyn jest bardzo silnie związana z ich budową chemiczną. Kluczowe znaczenie ma obecność grupy hydroksylowej w pozycji 4' pierścienia aromatycznego w łańcuchu bocznym. Ugrupowanie to korzystnie wpływa na parametry farmakokinetyczne i trwałość leku.

Cefalosporyny I generacji są aktywne wobec szczepów gronkowców penicylinoopornych, są wrażliwe na działanie β -laktamaz oraz słabo przenikają do płynu mózgowo-rdzeniowego. Wskazaniami do zastosowania leków z tej grupy są między innymi: zakażenia pałeczkami zapalenia płuc, infekcje dróg moczowych i oddechowych, niektóre zakażenia skóry i tkanek miękkich. Niekiedy stosuje się je również w skojarzeniu z gentamycyną.

Tabela 2. Cefalosporyny I generacji

		
Nazwa antybiotyku	- R	- X
Cefapiryna		
Cefazolina		
Cefaleksyna		H
Cefadroksyl		H
Cefradyna		H

2.2.2.2. II generacja

Cefalosporyny II generacji (Tabela 3) charakteryzują się większą aktywnością przeciwbakteryjną w stosunku do bakterii Gram-ujemnych niż cefalosporyny I generacji. Niektóre z nich działają również na *Bacteroides fragilis*. Do generacji tej zalicza się także tzw. cefamycyny – zawierają one grupę OCH₃ w pozycji C7.

Do II generacji cefalosporyn zalicza się:

- cefamandol,
- cefuroksym,
- cefotiam,
- ceforanid,
- cefmetazol,
- cefoksytynę,
- cefotetan,
- cefaklor,
- cefprozil,
- lorakarbef.

Dla aktywności przeciwbakteryjnej tej grupy cefalosporyn w stosunku do szczepów Gram-ujemnych istotny jest podstawnik *N*-metylotetrazolotymetylowy w pozycji 3. Jest on odpowiedzialny za wzrost skuteczności oraz hamowanie procesu metabolizmu leków tej grupy. Z jego obecnością związane jest również zahamowanie aktywności dehydrogenazy alkoholowej, czego następstwem jest tzw. reakcja disulfiramowa. Podstawniki metoksyiminowy oraz furylometylowy stabilizują wiązanie β-laktamowe i chronią je przed działaniem β-laktamaz. Podobną funkcję pełni ugrupowanie alkoksyiminowe w podstawniku C7 lub grupa metoksylova w pozycji 7a. Wzrost aktywność wobec *Staphylococcus spp.* uwarunkowana jest obecnością podstawnika tiofenometylowego, natomiast podstawnik karbamoilooksymetylowy ogranicza metabolizm tej grupy leków.

Cefalosporyny II ze względu na szerokie spektrum aktywności przeciwbakteryjnej są powszechnie stosowane w farmakoterapii. Wykorzystuje się je w leczeniu infekcji dróg żółciowych, układu moczowo-płciowego i oddechowego. Wskazaniemi do zastosowania mogą być również: zapalenie wsierdza, stany zapalne kości czy rzeżączka oporna na penicylinę. Stosuje się je także u osób z nadwrażliwością na aminopenicyliny oraz w zakażeniach pooperacyjnych spowodowanych bakteriami Gram-ujemnymi.

Tabela 3. Cefalosporyny II generacji

Nazwa antybiotyku	- R	- X	- Z	- Y
Cefamandolu nafan			H	S
Cefonicyd			H	S
Cefuroksym		-CH ₂ OCONH ₂	H	S
Cefoksytyna		-CH ₂ OCONH ₂	OCH ₃	S
Cefotetan			OCH ₃	S
Cefaklor		Cl	H	S
Lorakarbef		Cl	H	CH ₂
Cefprozil			H	S

2.2.2.3. III generacja

III generacja (Tabela 4) stanowi najliczniejszą, najczęściej stosowaną i najbardziej zróżnicowaną pod względem aktywności bakteriobójczej i właściwości farmakokinetycznych grupę cefalosporyn. Antybiotyki należące do tej grupy są skuteczniejsze w zakażeniach szczepami należącymi do *Enterobacteriaceae* cefalosporyny I generacji. Niektóre wykazują również aktywność wobec *Pseudomonas aeruginosa*.

Do III generacji cefalosporyn zalicza się:

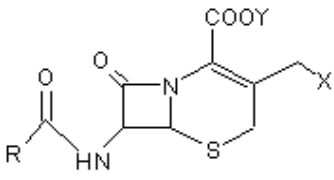
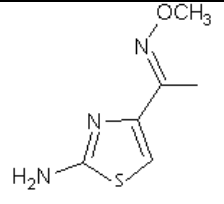
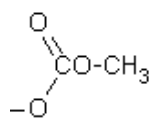
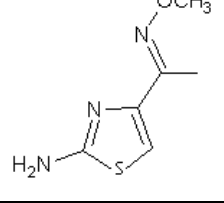
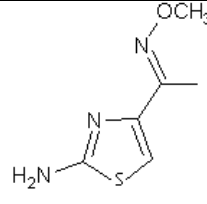
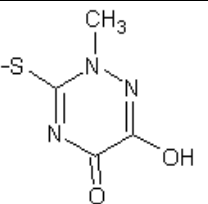
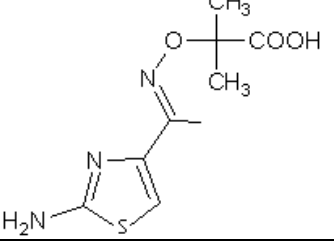
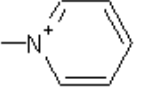
- cefoperazon,
- cefotaksym,
- ceftriakson,
- ceftazydym,
- cefsulodynę,
- ceftizoksym,
- latamoksef,
- flomoksef,
- cefiksym,
- ceftibuten,
- cefpodoksym proksetylu,
- cefetamet piwoksylu,
- ceftiofur sodowy.

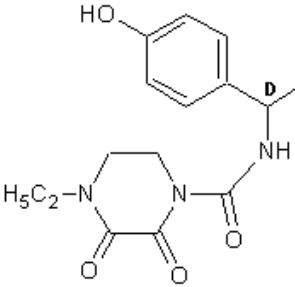
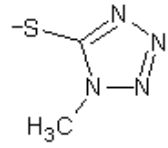
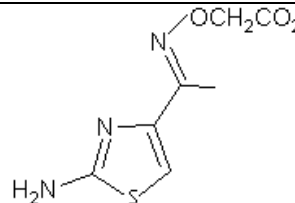
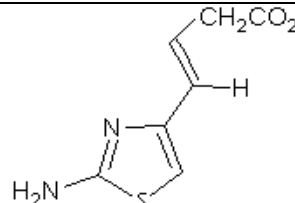
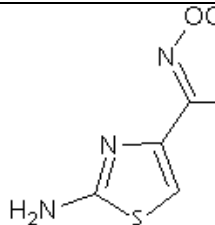
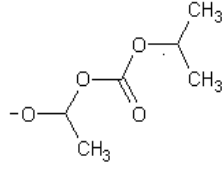
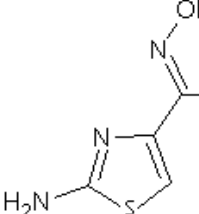
Podobnie jak ma to miejsce w I i II generacji, również w tej grupie antybiotyków występuje zależność między budową chemiczną a działaniem. Cefalosporyny posiadające ugrupowanie alkoksyliminowe w pozycji *syn* w podstawniku acylowym przy atomie węgla C7 wykazują znaczącą oporność na działanie β -laktamaz. Na profil aktywności przeciwbakteryjnej ceftazydymu wpływa podstawnik karboksypropylowy, połączony z ugrupowaniem iminowym w łańcuchu bocznym. W przypadku cefsulodiny kluczowy jest natomiast podstawnik sulfonowy. Powoduje on wzrost polarności cząsteczki i ułatwienie penetracji, głównie u bakterii *Pseudomonas*. Do III generacji cefalosporyn zalicza się też ureidocefalosporyny (np. cefoperazon). Za wzrost aktywności w stosunku do szczepów bakterii Gram-dodatnich,

Enterobacteriaceae oraz *P. aeruginosa* odpowiada podstawnik 2,3-diketopiperazynowy. Łańcuch ureidowy nie przyczynia się jednak do wytworzenia oporności na β -laktamazy.

Dzięki dużej aktywności przeciwbakteryjnej, dobrej przenikalności do płynu mózgowo-rdzeniowego oraz znacznej oporności na działanie β -laktamaz, cefalosporyny III generacji są szeroko stosowane w praktyce klinicznej. Wskazaniami do zastosowania antybiotyków tej grupy są między innymi: zakażenia układu moczowego, pokarmowego, oddechowego, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowego, kości, stawów, rzeżączka. Ponadto wykorzystuje się je w farmakoterapii zakażeń szpitalnych wywołanych bakteriami Gram-ujemnymi i mieszaną florą bakteryjną.

Tabela 4. Cefalosporyny III generacji

			
Nazwa antybiotyku	- R	- X	- Y
Cefotaksym			H
Ceftizoksym		H	H
Ceftriakson			H
Ceftazydym			H

Cefoperazon			H
Cefiksym		-HC=CH ₂	H
Ceftibuten		H	H
Cefpodoksym proksetylu		-OCH ₃	
Cefdinir		-HC=CH ₂	H

2.2.2.4. IV generacja

Cefalosporyny IV generacji (Tabela 5) wykazują szersze spektrum aktywności przeciwko drobnoustrojom Gram-ujemnym, niż antybiotyki III generacji. Ponadto cechują się one większą opornością na działanie β -laktamaz.

Do cefalosporyn IV generacji należą:

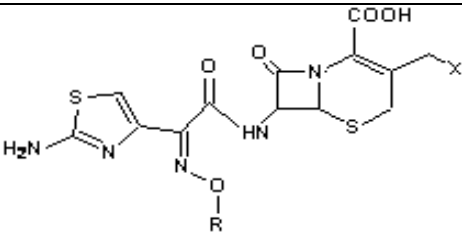
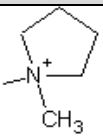
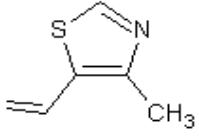
- cefpiron,
- cefepim,
- cefdinir,
- cefditoren piwoksylu,

- siarczan cefoseliny,
- siarczan cefkwinomu.

Dla IV generacji cefalosporyn charakterystycznymi elementami budowy chemicznej są: ugrupowanie alkoksyiminowe, podstawnik 2-aminotiazolowy. oraz podstawnik z ugrupowaniem amoniowym w pozycji C3.

Cefalosporyny IV generacji podawane są pozajelitowo. Antybiotyki te dobrze przenikają do płynu mózgowo-rdzeniowego. Wskazaniami do zastosowania tej grupy leków są: posocznica, zakażenia w obrębie jamy brzusznej, zapalenie płuc, gorączka u pacjentów z neutropenią, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych o etiologii bakteryjnej, zakażenia skóry, dróg moczowych, górnych i dolnych dróg oddechowych.

Tabela 5. Cefalosporyny IV generacji

		
Nazwa antybiotyku	-R	-X
Cefepim	-CH ₃	
Cefdinir	-H	=CH ₂
Cefditoren	-CH ₃	

2.2.2.5. Cefalosporyny V generacji [44-46]

Do V generacji cefalosporyn (Tabela 6) należą antybiotyki wykazujące potencjalnie wysoką aktywność wobec: metycylinoopornych szczepów *S. aureus* (MRSA - methycyllin resistant *Staphylococcus aureus*), penicylinoopornych szczepów *S. pneumoniae* (PRSP - penicillin resistant *Streptococcus Pneumoniae*) oraz szczepów *S. aureus* opornych na wankomycynę (VRSA - vankomycin resistant *Staphylococcus aureus*). Właściwości te wiążą się z dodatkowym mechanizmem ich działania.

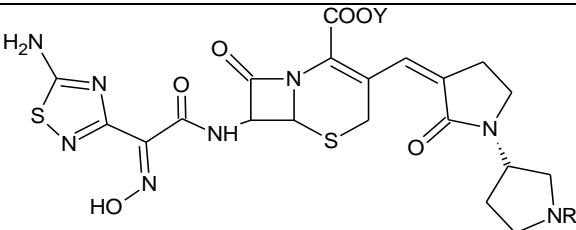
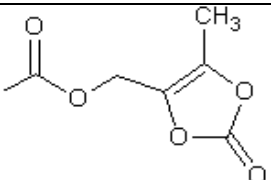
Do V generacji zalicza się:

- ceftobiprol,
- sól sodową medokarilu ceftobiprołu.

W przypadku ceftobiprołu kluczowa dla oporności wobec β -laktamaz jest obecność ugrupowania oksyiminoaminiotiazolidynowego w łańcuchu bocznym przy C7. Za wiązanie do białek wiążących penicylinę typu 2a u metycylinoopornych gronkowców odpowiada reszta winylopirolidynowa. Wskazaniami do zastosowania ceftobiprołu są m.in.: ciężkie zakażenia skóry i stopa cukrzycowa. Lek ten podawany jest pozajelitowo. Wydalany jest z moczem w postaci niezmienionej.

Sól sodowa medokarilu ceftobiprołu posiada podstawnik pirolidynowy. Wykazuje ona aktywność wobec drobnoustrojów Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i beztlenowców. Jest także skuteczna w leczeniu infekcji wywołanych przez metycylinooporne i wankomycynooporne gronkowce. Antybiotyk stosuje się w szpitalnych zapaleniach płuc, w gorączce i neutropenii u pacjentów otrzymujących chemioterapię oraz w ciężkich zakażeniach skóry. Sól sodowa medokarilu ceftobiprołu jest pro-lekiem i w organizmie ulega metabolizmowi do aktywnego ceftobiprołu. Lek wydalany jest z organizmu w postaci niezmienionej, głównie z moczem.

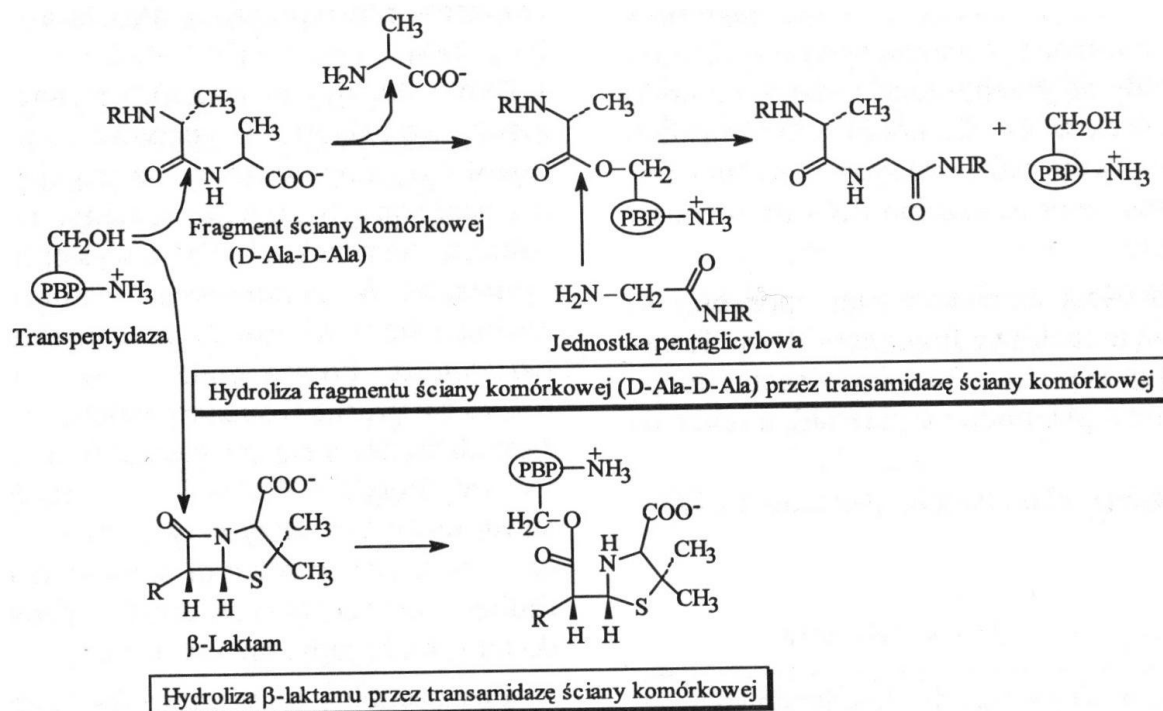
Tabela 6. Cefalosporyny V generacji

		
Nazwa antybiotyku	-R	-Y
Ceftobiprol	-H	-H
Sól sodowa medokarilu ceftobiprolu		Na

2.3. Mechanizm działania cefalosporyn [36, 47-49]

Cefalosporyny, podobnie jak inne antybiotyki β -laktamowe, wykazują aktywność bakteriobójczą w wyniku hamowania biosyntezy ściany komórkowej drobnoustrojów. Mechanizm ten wiąże się hamowaniem aktywności enzymów: endopeptydazy, karboksypeptydazy oraz transpeptydazy, czyli białek wiążących penicylinę (PBP – *penicillin binding proteins*). Białka te biorą udział w biosyntezie mureiny, stanowiącej podstawowy element budulcowy ściany komórki bakteryjnej. Substratami do syntezy mureiny są *N*-acetyloglukozamina i kwas *N*-acetylmuraminowy. Związki te powstają w cytoplazmie i następnie są transportowane do błony cytoplazmatycznej, gdzie znajdują się transpeptydazy. Enzymy te odpowiadają za przyłączanie nowych elementów do wydłużającego się łańcucha peptydoglikanu. Częsteczka antybiotyku wiążąc się z miejscem aktywnym PBP powoduje inaktywację enzymu. Prowadzi to do zahamowania biosyntezy ściany komórkowej, zwiększenia aktywności wewnątrzkomórkowych hydrolaz, nasilenia procesów autolitycznych oraz wzrostu ciśnienia osmotycznego i ostatecznie do śmierci komórki. Najważniejszym elementem budowy chemicznej antybiotyku, odpowiedzialnym za aktywność bakteriobójczą jest obecność w jego cząsteczce niezmienionego pierścienia β -laktamowego. Istotne jest również aby lek oddziaływał na bakterie będące w fazie aktywnego namnażania. Efektywność antybiotyku uwarunkowana jest stopniem jego powinowactwa do białek wiążących penicylinę, ich liczbą i dostępnością dla leku oraz obecnością inaktywujących go

mechanizmów (np. β -laktamazy). Dodatkowymi przeszkodami dla antybiotyków w przypadku bakterii Gram-ujemnych jest bariera błony zewnętrznej oraz przestrzeń periplazmatyczna. Schemat działania antybiotyków β -laktamowych został przedstawiony na rycinie 5.



Ryc. 5. Wiązania poprzeczne ściąny komórkowej i model działania β -laktamów [36].

2.4. Działania niepożądane cefalosporyn [38, 42, 43, 50-52]

Cefalosporyny charakteryzują się niską toksycznością oraz dobrą tolerancją. Najczęściej występującym działaniem niepożądanym po zastosowaniu tej grupy antybiotyków jest reakcja uczuleniowa, objawiająca się głównie gorączką, pokrzywką, wysypką grudkowo-plamkową, skurczem oskrzeli oraz sporadycznie wstrząsem anafilaktycznym. W porównaniu do penicylin, cefalosporyny znacznie rzadziej powodują wystąpienie objawów uczuleniowych. Wykazano istnienie reakcji krzyżowej między penicylinami a cefalosporynami. Około 20% populacji uczulonej na penicyliny wykazuje również uczulenie na cefalosporyny. Innym objawem niepożądanym antybiotyków cefalosporynowych jest dodatni odczyn Coombsa. Polega on na zlepianiu erytrocytów pod wpływem osocza krwi baraniej. Powstawaniu tego

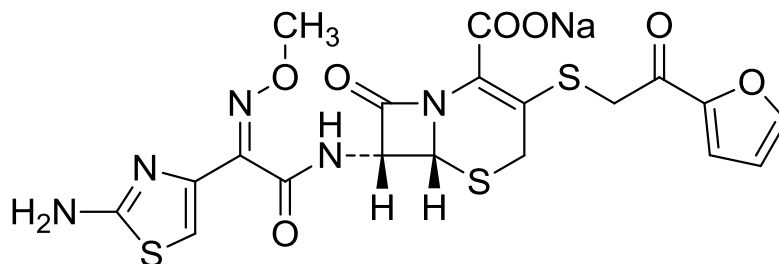
zjawiska sprzyja niewydolność nerek, hipalbuminemia oraz stosowanie dużych dawek leku. Cefalosporyny mogą powodować również dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego, takie jak zaburzenia żołądkowo-jelitowe (np. biegunka) czy rzekomobłoniaste zapalenie jelita grubego. Antybiotyki cefalosporynowe mogą przyczyniać się do powstawania zmian w obrazie krwi: trombocytopenii, eozynofilii oraz neutropenii. Lekami posiadającymi ugrupowanie N-metylotiotetrazolowe, które odpowiedzialne jest za zaburzenia krzepnięcia i wydłużenie czasu krwawienia oraz nietolerancję alkoholu są cefalotyna, cefamandol, cefoperazon i cefoten. Do istotnych działań niepożądanych cefalosporyn należy także nefrotoksyczność, jednakże wprowadzenie nowszych generacji leków zminimalizowało częstotliwość jego występowania. Wystąpienie poszczególnych działań ubocznych jest często związane z drogą podania leku. Po podaniu dożylnym może dojść do zakrzepowego zapalenia żył, natomiast iniekcja domięśniowa może skutkować wystąpieniem silnego bólu oraz powstawaniem ropni. Podanie cefalosporyn do płynu mózgowo-rdzeniowego jest związane z ryzykiem uszkodzenia układu nerwowego. Zaobserwowano, że w trakcie farmakoterapii cefalosporynami bardzo rzadko występują także ból i zawroty głowy, uczucie zmęczenia, oczopląs, omamy i drgawki.

2.5. Charakterystyka wybranych antybiotyków cefalosporynowych

2.5.1. Ceftiofur sodowy

a) Budowa cząsteczki i nazewnictwo [53]

Wzór strukturalny:



Wzór sumaryczny:



Nazwa chemiczna:

Sodu (6*R*,7*R*)-7-[[[(2*Z*)-(2-amino-4-tiazolilo)(metoksyimino)-acetylo]amino]-3-[[[(2-furanylokarbonylo)tio]metylo]-8-okso-5-tia-1-azabicyklo[4.2.0]okt-2-eneo-2-karboksylan

b) Właściwości fizykochemiczne [54]

Postać:

biały lub żółty, krystaliczny proszek

Masa cząsteczkowa:

545,56 g/mol

Rozpuszczalność:

23 g/l w wodzie w temperaturze 25°C

c) Właściwości farmakologiczne i farmakokinetyczne [55-57]

Ceftiofur zaliczany jest do III generacji cefalosporyn. Wykazuje aktywność przeciwko drobnoustrojom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym, w tym szczepom wytwarzającym β -laktamazy. Antybiotyk ten stosowany jest w weterynarii w postaci kwasu, chlorowodoru

lub soli sodowej. Ceftiofur podaje się trzodzie chlewnej w zakażeniach układu oddechowego spowodowanych przez: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, jak również w przypadkach posocznicy, zapaleń wielostawowych oraz zapaleń błon surowiczych wywołanych przez *Streptococcus suis*. Lek ten wykorzystuje się w chorobach infekcyjnych bydła, drobiu i koni.

Ceftiofur wykazuje niską toksyczność po podaniu parenteralnym. W organizmie zwierząt lek szybko metabolizuje do defuroyloceftiofuru. Ceftiofur, jak również jego metabolit, wykazują podobną aktywność wobec patogenów i w jednakowym stopniu (70%) wiążą się z białkami osocza. Efektywne stężenie antybiotyku w osoczu ($> 0,2 \mu\text{g/ml}$) utrzymuje się przez pożądany czas. Lek wydalany jest głównie z moczem (55-60%) oraz z kałem (15-30%). Droga eliminacji uzależniona jest od gatunku zwierzęcia, któremu podano lek.

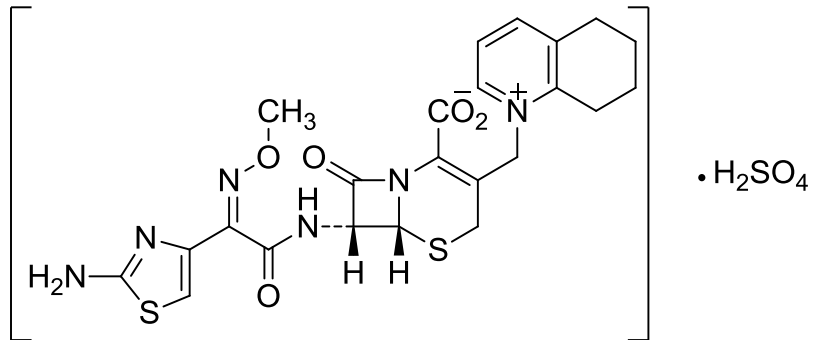
d) Ocena trwałości - przegląd literatury

Badania trwałości ceftiofuru wskazują na znaczącą podatność leku na hydrolizę w obecności kwasów, zasad i enzymów. W jej wyniku powstaje szereg nietrwałych produktów rozkładu, głównie defuryloceftiofur. W zależności od pH, defuryloceftiofur może ulegać przekształceniu do dimeru disulfidowego (w obecności zasady i H_2O_2) lub odpowiedniego tiolaktonu (w obecności kwasów) [58]. Sunkurra i Navarre zbadali wpływ pH i temperatury na trwałość ceftiofuru w roztworach wodnych i wykazali, że w temperaturze 60°C i przy $\text{pH} = 7,4$ lek jest bardziej podatny na rozkład przy niższych wartościach pH. Autorzy potwierdzili, że defuryloceftiofur powstaje głównie przy $\text{pH} = 10$. Stała szybkości rozkładu ceftiofuru zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury [59]. Antybiotyk ulega także rozkładowi pod wpływem czynników utleniających [60] i światła [61].

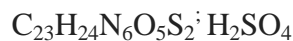
2.5.2. Siarczan cefkwinu

a) Budowa cząsteczki i nazewnictwo [62]

Wzór strukturalny:



Wzór sumaryczny:



Nazwa chemiczna:

[(6*R*,7*R*)-7-[[*(Z)*-(2-Amino-4-tiazol-4-ilo)-2-(metoksyimino)-acetylo]-amino]-8-okso-3-(5,6,7,8-tetrahydrochinolinium-1-ylometylo)-5-tia-1-azabicyklo [4.2.0]okt-2-eno-2-ylo]-karboksylanu siarczan

b) Właściwości fizykochemiczne [63]

Postać:

biały lub prawie biały proszek

Masa cząsteczkowa:

626,6823 g/mol

Rozpuszczalność:

dobrze rozpuszczalny w wodzie, trudno rozpuszczalny w etanolu, praktycznie nierozpuszczalny w eterze dietylowym i chloroformie

c) Właściwości farmakologiczne i farmakokinetyczne [64,65]

Cefkwinom należy do IV generacji cefalosporyn. Lek stosowany jest w weterynarii, głównie w leczeniu chorób zakaźnych u bydła i trzody chlewnej. Cefkwinom posiada szerokie spektrum aktywności przeciwbakteryjnej oraz wykazuje wysoką oporność na działanie chromosomalnych i plazmidowych β -laktamaz. Antybiotyk działa na *Staphylococcus aureus*, streptokoki, *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinobacillus equuli* i bakterie z rodziny

Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. i *Serratia marcescens*). Ograniczona jest natomiast jego aktywność wobec *Rhodococcus* spp.

Cefkwinom słabo wiąże się (poniżej 10%) z białkami osocza. Po podaniu pozajelitowym ulega szybkiej dystrybucji, wykazując wysokie i długo utrzymujące się stężenie we krwi. Czas półtrwania leku po podaniu dożylnym w dawce 10 mg/kg masy ciała mieści się w granicach od 0,98 – 1,33 h i uzależniony jest od gatunku zwierzęcia u którego został zastosowany. Cefkwinom jest wydalany głównie przez nerki.

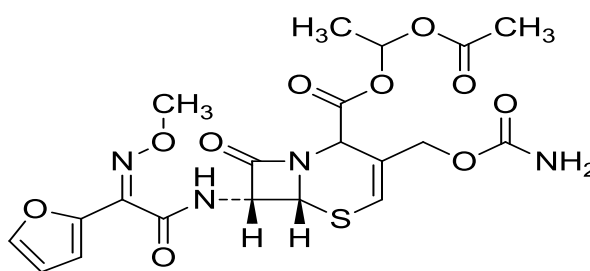
d) Ocena trwałości – przegląd literatury [66]

Badania trwałości wodnych roztworów siarczanu cefkwinomu przeprowadzone przez Shantiera i współpracowników wskazują, że lek ten ulega rozkładowi w wyniku hydrolizy, zależnej od temperatury i stężenia jonów wodorotlenowych. Stopień rozkładu cefkwinomu, a w konsekwencji $t_{1/2}$ zmniejsza się wraz ze zwiększeniem stężenia wodorotlenku sodu (od 0,5-2,0 mol/l). Wykazano również, że lek jest trwały w kwasowym pH (2-6), nawet w temperaturze powyżej 80°C.

2.5.3. Cefuroksym aksetylu

a) Budowa cząsteczki i nazewnictwo [67]

Wzór strukturalny:



Wzór sumaryczny:



Nazwa chemiczna:

Mieszanina dwóch diastereoizomerów (1*RS*)-1-(acetyloksy)etylu (6*R*,7*R*)-3-[(karbamoiloksy)metylo]-7-[[*Z*]-2(furan-2-yl)-2-(metoksyimino)acetylo]amino]-8-okso-5-tia-1-azabicyklo[4.2.0]okt-2-eno-2-karboksylanu

b) Właściwości fizykochemiczne [67]

Postać: biały proszek

Masa cząsteczkowa: 510,5 g/mol

Rozpuszczalność: trudno rozpuszczalny w wodzie, rozpuszczalny w acetonie, w octanie etylu i metanolu, trudno rozpuszczalny w etanolu (96%)

c) Właściwości farmakologiczne i farmakokinetyczne [68,69,70]

Cefuroksym aksetylu, będący estrem acetoksyetylowym cefuroksymu, należy do II generacji cefalosporyn. Cefuroksym aksetylu jest mieszaniną dwóch diastereoizomerów. Izomer Z charakteryzuje się wysoką opornością na działanie β -laktamaz i łatwo przenika przez błony, natomiast izomer E (anty-cefuroksym aksetylu) ulega deaktywacji pod wpływem β -laktamaz i cechuje się gorszą przenikalnością przez błony. Cefuroksym jest skuteczny w leczeniu większości infekcji układu oddechowego. Wykorzystywany jest także w zakażeniach układu moczowo-płciowego, skóry i tkanek miękkich. Antybiotyk wykazuje aktywność w stosunku do licznych szczepów bakteryjnych, zarówno Gram-dodatnich, jak również Gram-ujemnych. Cefuroksym jest stosowany w zakażeniach następującymi drobnoustrojami: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* oraz innymi streptokokami (poza grupą D), *Moraxella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. i *Staphylococcus aureus* (szczepy wrażliwe na metycylinę).

Cefuroksym aksetylu jest prolekiem i w ustroju pod wpływem niespecyficznych esteraz szybko hydrolizuje do cefuroksymu. Biodostępność leku po doustnym podaniu tabletek zawierających 500 mg cefuroksymu aksetylu wynosi 68%. Antybiotyk wiąże się z białkami osocza w 50%. Średni czas półtrwania leku w organizmie wynosi 1,2-1,4 h. Główną drogą eliminacji cefuroksymu są nerki.

d) Ocena trwałości – przegląd literatury [70-73]

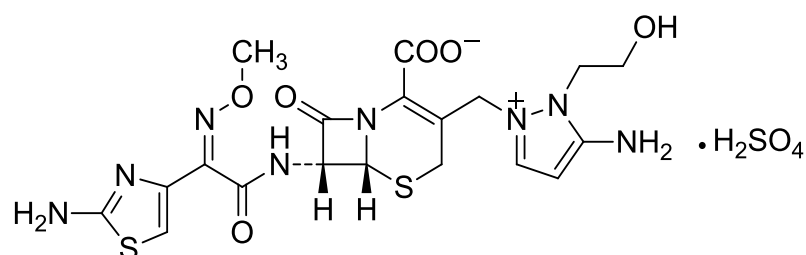
Badania trwałości cefuroksymu aksetylu przeprowadzono w fazie stałej, w postaci amorficznej i krystalicznej, a także w tabletkach. Wykazano, że mechanizm rozkładu

cefuroksymu jest zależny od wilgotności względnej powietrza oraz postaci polimorficznej. W warunkach suchego powietrza rozkład zachodzi zgodnie modelem reakcji pseudo-pierwszego rzędu i jest odwracalny. W przypadku podwyższonej wilgotności względnej rozkład cefuroksymu aksetylu ma charakter autokatalicznej reakcji pierwszego rzędu, odwracalnej dla postaci amorficznej, nieodwracalnej natomiast dla postaci krystalicznej. Wykazano również, że diastereoizomer B jest bardziej trwały niż diastereoizomer A. Podstawowymi zanieczyszczeniami cefuroksymu, mogącymi być również produktami rozkładu leku są diastereoizomery A i B anty-cefuroksymu aksetylu oraz Δ^3 -izomer cefuroksymu. Cefuroksym aksetylu ulega konwersji do anty-cefuroksymu pod wpływem kwasów, światła i podwyższonej temperatury. Δ^3 -izomer powstaje w obecności zasad oraz w podwyższonej temperaturze.

2.5.4. Siarczan cefoseliny

a) Budowa cząsteczki i nazewnictwo [74]

Wzór strukturalny:



Wzór sumaryczny:



Nazwa chemiczna:

(6*R*,7*R*)-3-[[3-Amino-2-(2-hydroksyetylo)-2*H*-pirazol-1-ium-1-ylo]metylo]-7-[(*Z*)-2-(2-aminotiazol-4-ylo)-2-metoksyiminoacetyloamino]-8-okso-5-tia-1-azobicyklo[4.2.0]okt-2-eno-2-karboksylu monosiarczan

b) Właściwości fizykochemiczne [75]

Postać:

biały lub jasnożółty, krystaliczny proszek

Masa cząsteczkowa:

620,64 g/mol

Rozpuszczalność: rozpuszczalny w dimetylosulfotlenku, praktycznie nierozpuszczalny w etanolu (95%) i eterze dietylowym

c) Właściwości farmakologiczne i farmakokinetyczne [76-78]

Cefoselina należy do cefalosporyn IV generacji i jest podawana wyłącznie pozajelitowo. Może być wykorzystana w leczeniu zakażeń szpitalnych ze względu na szerokie spektrum działania przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym. Badania aktywności mikrobiologicznej *in vitro* wykazały, że skuteczność cefoseliny w stosunku do *Escherichia coli* jest zbliżona do cefepimu i cefpiromu. Wykazuje ona natomiast większą aktywność przeciwko *Klebsiella pneumoniae* i *Proteus mirabilis*. W przypadku zakażeń wywołanych przez *Acinetobacter* spp. i *Stenotrophomonas maltophilia* działanie cefoseliny jest ograniczone. Istotną właściwością cefoseliny jest jej wysokie powinowactwo do białek wiążących penicyliny typu 2a (PBP2a). Dzięki temu lek ten wykazuje aktywność przeciwko *Staphylococcus aureus*, zarówno w stosunku do szczepów wrażliwych na metycylinę (MSSA-methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*), jak również szczepów opornych na metycylinę (MRSA). Działanie na szczepy MSSA jest jednak silniejsze niż na MRSA.

Czas półtrwania cefoseliny po podaniu dożylnym wynosi 2,5 h. Cefoselina jest eliminowana przez nerki. Wykazano również, że lek przenika przez barierę krew-mózg na poziomie 10-20%. Może być więc potencjalnie wykorzystany w leczeniu zakażeń mózgu. Przeciwwskazaniem do zastosowania cefoseliny jest niewydolność nerek, która prowadzi do znacznego wydłużenia czasu eliminacji.

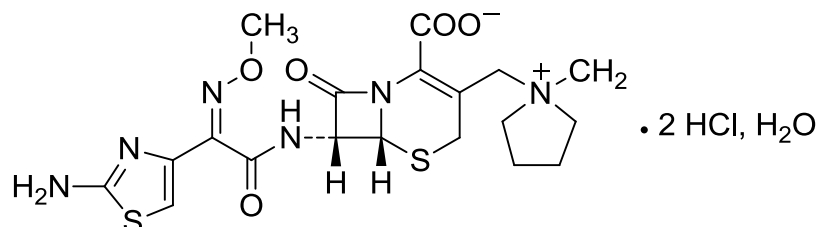
d) Ocena trwałości – przegląd literatury [79-82]

Badania trwałości siarczanu cefoseliny zostały przeprowadzone w fazie stałej, w postaci roztworów wodnych oraz w roztworach do podania pozajelitowego. Wykazano, że ulega on rozkładowi na skutek hydrolizy zachodzącej w obecności kwasów, jak również zasad. Efekt katalityczny zaobserwowano w buforach: fosforanowym (pH 1,89-3,10 oraz 6,16-7,61) oraz octanowym (pH 4,0-6,5). Cefoselina charakteryzuje się największą trwałością w zakresie pH 4,0-6,5 natomiast w środowisku zasadowym (pH>11,4) ulega najszybszej degradacji. Antybiotyk wykazuje również podatność na działanie czynników utleniających (30% H₂O₂ w temperaturze 40°C) oraz światła słonecznego. Natomiast podwyższona temperatura (100°C, 30 dni) nie wpływa na trwałość cefoseliny.

2.5.5. Dichlorowodorek cefepimu jednowodny

a) Budowa cząsteczki i nazewnictwo [67]

Wzór strukturalny:



Wzór sumaryczny:



Nazwa chemiczna:

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

b) Właściwości fizykochemiczne [67]

Postać:

biały lub prawie biały, krystaliczny proszek

Masa cząsteczkowa:

571,5 g/mol

Rozpuszczalność:

łatwo rozpuszczalny w wodzie i w metanolu, praktycznie nie rozpuszczalny w chlorku metylenu

c) Właściwości farmakologiczne i farmakokinetyczne [83-85]

Cefepim, podobnie jak inne cefalosporyny IV generacji wykazuje szersze spektrum aktywności bakteriobójczej niż cefalosporyny III generacji. Charakteryzuje się on również większą aktywnością przeciwko tlenowym Gram-dodatnim drobnoustrojom. Cefepim jest niewrażliwy na działanie wielu powszechnie występujących β -laktamaz (zarówno plazmidowych, jak również chromosomalnych). Lek jest też słabym induktorem β -laktamaz I typu. Dzięki temu, że cząsteczka cefepimu posiada strukturę jonu obojnego możliwa jest jego penetracja przez poryny zewnętrznej błony bakterii Gram-ujemnych, co powoduje, że antybiotyk ten jest skuteczny w leczeniu zakażeń opornych na cefalosporyny III generacji. Cefepim wykorzystuje się głównie w farmakoterapii zapalenia płuc i innych infekcji dolnych

dróg oddechowych, układu moczowego, skóry i tkanek miękkich, zakażeń w obrębie jamy brzusznej oraz profilaktycznie w chirurgii dróg żółciowych i prostaty. Cefepim jest aktywny w stosunku do: *Streptococcus pneumoniae* (również szczepy odporne na penicylinę), *Staphylococcus aureus* (poza szczepami MRSA), *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Enterobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*.

Cefepim jest podawany w postaci iniekcji dożylnych lub domięśniowych. Charakteryzuje się on bardzo szybką absorpcją po podaniu domięśniowym, a jego biodostępność wynosi około 100%. Cefepim w niewielkim stopniu wiąże się z białkami osocza (14-19%). Antybiotyk dobrze przenika do śluzówki oskrzeli i do tkanki płucnej. Cefepim w postaci niezmienionej jest eliminowany przez nerki.

d) Ocena trwałości – przegląd literatury [86,87]

Fubara i Notari przeprowadzili badania trwałości cefepimu w roztworach wodnych. Określili wpływ pH, temperatury oraz rodzaju i stężenia buforów na kinetykę rozkładu cefepimu oraz wyznaczyli równania pozwalające przewidzieć trwałość leku w każdych warunkach pH i temperatury, w obecności lub nieobecności buforów. Ponadto Fubara i Notari eksperymentalnie udowodnili okres trwałości buforowych roztworów leku, przy wartości pH, w którym wykazują one największą trwałość, w temperaturze 30°C. Zbadano także wpływ L-argininy na rozkład cefepimu przy wartościach pH roztworów do wstrzykiwań. Wykazano istotny wpływ stężenia każdego z buforów (mrówczanowego, octanowego, boranowego i fosforanowego) na stałą szybkości rozkładu cefepimu. Efekt katalityczny wykazywały składniki buforów: fosforanowego zasadowego, boranowego zasadowego, mrówczanowego i octanowego. Nie stwierdzono efektu katalitycznego w buforach fosforanowym kwasowym i boranowym kwasowym. Oceniono wpływ wartości pH roztworu, w różnych temperaturach na stałą szybkości rozkładu cefepimu i wykazano, że otrzymany, typowy „U-kształtny” profil z przegięciem w zakresie kwasowym jest zbliżony do innych cefalosporyn. Fubara i Notari udowodnili także, że cefepim charakteryzuje się największą trwałością w zakresie pH od 4 do 6 oraz, że dodatek L-argininy tylko w niewielkim stopniu katalizuje rozkład leku.

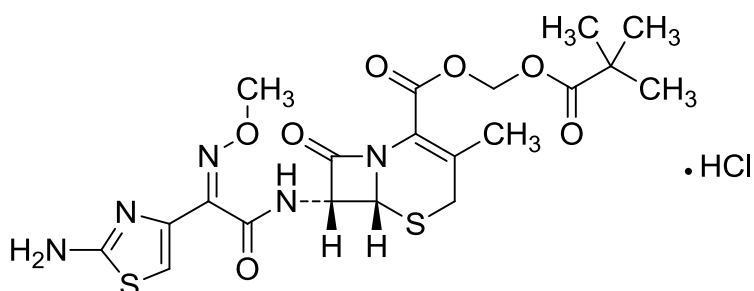
Badania wpływu temperatury i wilgotności względnej powietrza na trwałość cefepimu w fazie stałej wskazują, że rozkład leku zachodzi zawsze zgodnie z modelem kinetycznym reakcji

pierwszego rzędu, niezależnie od warunków otoczenia. Wykazano istotny wpływ temperatury i wilgotności na stałą szybkości rozkładu cefepimu.

2.5.6. Chlorowodorek cefetamet piwoksyli

a) Budowa cząsteczki i nazewnictwo [88]

Wzór strukturalny:



Wzór sumaryczny:



Nazwa chemiczna:

(6R,7R)-7-[[[(2Z)-2-(2-Amino-4-tiazolilo)-2(metoksyimino)-acetylo] amino]-3-metylo-8-okso-5-tia-1-azabicyklo[4.2.0]okt-2-eno-2-karboksylowy(2,2-dimetylo-1-oksopropoksy)-karbaminowego, chlorowodorek

b) Właściwości fizykochemiczne [88]

Postać:

prawie biały lub jasnożółty proszek

Masa cząsteczkowa:

548,03 g/mol

Rozpuszczalność:

rozpuszczalny w wodzie i w metanolu

c) Właściwości farmakologiczne i farmakokinetyczne [89,90]

Cefetamet piwoksyli oraz jego chlorowodorek są stosowanymi doustnie pochodnymi cefetamet – cefalosporyny III generacji. W przewodzie pokarmowym estry te pod wpływem enzymów ulegają hydrolizie do aktywnego leku. Antybiotyk ten posiada wysokie powinowactwo do białek wiążących penicylinę PBP3. Dzięki tym cechom cefetamet wykazuje szerokie spektrum aktywności przeciwko drobnoustrojom Gram-dodatnim, jak również Gram-ujemnym. Lek ten jest skuteczny w leczeniu infekcji wywołanych między

innymi przez względnie beztlenowe pałeczki Gram-ujemne, *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus* spp., *Branhamella catarrhalis*, *Neisseria* spp., *Vibrio* spp.

Biodostępność leku wzrasta o 50% gdy przyjmowany jest z posiłkiem. Spowodowane jest to zwiększonym wydzielaniem kwasu oraz dłuższym czasem opróżniania żołądka. Zaobserwowano, że po posiłku spada szybkość absorpcji leku. Cefetamet zastosowany w dawkach terapeutycznych (1-110 µg/ml) wiąże się z białkami osocza w 22%, niezależnie od stężenia i pH. Lek wydalany jest w formie niezmienionej wraz z moczem.

d) Ocena trwałości – przegląd literatury [91,92]

Wykazano, że wodne roztwory chlorowodoru cefetamet piwoksylu są najbardziej trwałe w zakresie pH od 3 do 5 oraz, że składniki buforów octanowego i fosforanowego katalizują rozkład cefetamet. Na rozkład leku składają się trzy niezależne reakcje katalizowane przez: jony wodorowe, cząsteczki wody oraz jony wodorotlenowe.

Badania trwałości chlorowodoru cefetamet piwoksylu w fazie stałej wykazały, że rozkład leku zachodzi z różnym mechanizmem kinetycznym, w zależności od wilgotności względnej powietrza. W suchym powietrzu rozkład zachodzi zgodnie z modelem reakcji pierwszego rzędu. Natomiast w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza rozkład ma charakter autokatalitycznej reakcji pierwszego rzędu.

3. Cel pracy

Celem mojej pracy jest określenie wpływu promieniowania jonizującego na trwałość wybranych antybiotyków cefalosporynowych w fazie stałej oraz ocena możliwości zastosowania sterylizacji radiacyjnej jako metody ich wyjaławiania.

Do badań wybrano następujące cefalosporyny:

- ceftiofur sodowy,
- siarczan cefkwinomu,
- cefuroksym aksetylu,
- siarczan cefoseliny,
- dichlorowodorek cefepimu jednowodny,
- chlorowodorek cefetametu piwoksyli.

Wybrane antybiotyki cefalosporynowe są podatne na rozkład w warunkach podwyższonej wilgotności względnej i temperatury, dlatego też nie mogą być sterylizowane metodami termicznymi. Zgodnie z wytycznymi EMA, alternatywnym sposobem wyjaławiania termolabilnych leków jest sterylizacja radiacyjna [93]. Istotna jest więc ocena trwałości takich leków na działanie promieniowania jonizującego. W dostępnej literaturze brak jest danych odnośnie radiotrwałości powyższych cefalosporyn.

Badane substancje zostaną poddane działaniu różnych dawek promieniowania (25 - 400 kGy) w liniowym akceleratorze elektronów. Następnie, w celu wykrycia potencjalnych zmian właściwości fizykochemicznych oraz aktywności bakteriobójczej, napromieniowane cefalosporyny będą analizowane z wykorzystaniem metod mikrobiologicznych, spektroskopowych (FT-IR, spektroskopia Ramana, EPR), termicznych (DSC), chromatograficznych (HPLC, UHPLC), organoleptycznych i innych (XRPD, SEM). Dodatkowo, dla cefuroksymu aksetylu przeprowadzona będzie analiza trwałości dla różnych postaci polimorficznych tej substancji (postać amorficzna i krystaliczna). Udowodniono, że w przypadku cefuroksymu aksetylu na skutek działania czynników fizykochemicznych, możliwe są przejścia pomiędzy poszczególnymi polimorfami. Ma to istotne znaczenie, gdyż polimorfizm może mieć wpływ na szybkość rozpuszczania leku, a co za tym idzie na jego biodostępność.

W pierwszym etapie badań zostaną ocenione zmiany właściwości napromieniowanych cefalosporyn z wykorzystaniem metod bezpośrednich tzn. takich które nie wymagają wstępnego przygotowania próbki. Następnie zostaną zastosowane metody pośrednie, które wymagają przeprowadzenia próbki w inny stan skupienia lub innych specjalnych przygotowań.

Zaplanowano, że założony cel badań zostanie osiągnięty dzięki realizacji następujących zadań badawczych:

- ocena wpływu promieniowania jonizującego w dawce 25 kGy (zalecanej do osiągnięcia jałowości wg normy EN 552) na trwałość i aktywność mikrobiologiczną wybranych leków,
- zdefiniowanie mechanizmu oddziaływania promieniowania jonizującego z wybranymi cefalosporynami, poprzez zastosowanie wyższych dawek promieniowania oraz określenie zachodzących zmian,

Powyższe badania dostarczą informacji niezbędnych do zdefiniowania radiotrwałości wybranych substancji leczniczych, jak również pozwolą określić czy promieniowanie jonizujące może być wykorzystane do ich sterylizacji.

4. Część doświadczalna

4.1. Materiał do badań

Materiał do badań stanowiło sześć antybiotyków cefalosporynowych, których charakterystyka została przedstawiona w rozdziale 2.5:

- Ceftiofur sodowy CFT
Numer serii: 70710
Zawartość substancji czynnej: > 98%
Producent: Molekula, Wassex House, Shaftesbury, Dorset, SP7 9PX, Wielka Brytania
- Siarczan cefkwinomu CFK
Numer serii: WZG101230-021
Zawartość substancji czynnej: 98%
Producent: Bepfarm LTD, District, Shanghai 200433, Chiny
- Cefuroksym aksetylu (postać amorficzna) CAA
Numer serii: 100192 (11004)
Zawartość substancji czynnej: 96,5%
Producent: Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, Starościńska 5, 02-516 Warszawa
- Cefuroksym aksetylu (postać krystaliczna) CAK
Numer serii: 100193 (11005)
Zawartość substancji czynnej: 98,6%
Producent: Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, Starościńska 5, 02-516 Warszawa
- Siarczan cefoseliny CSS
Numer serii: 20091228
Zawartość substancji czynnej: 99,5%
Producent: XINGCHENG CHEMPHARM CO., LTD., Taizhou, Chiny

-
- Dichlorowodorek cefepimu jednowodny (preparat Maxipime[®]) CFP
Numer serii: 1E00269
Zawartość substancji czynnej: > 99 % oraz L-arginina (725 mg/g cefepimu)
Producent: Bristol-Myers Squibb Polska Sp. z o.o., Al. Armii Ludowej 26, 00-609 Warszawa
 - Chlorowodorek cefetametu piwoksyli CFE
Numer serii: 1001656
Zawartość substancji czynnej: 98,5%
Producent: Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, Starościńska 5, 02-516 Warszawa

4.2. Odczynniki i substancje wzorcowe

Do badań zastosowano następujące odczynniki chemiczne:

- Wodorofosforan disodowy bezwodny, POCh Gliwice,
- Octan amonowy, POCh Gliwice,
- Kwas mrówkowy 98-100% CZDA, POCh Gliwice,
- Kwas ortofosforowy 85%, POCh Gliwice,
- Diwodorofosforan amonowy, POCh Gliwice,
- Metanol CZDA, POCh Gliwice,
- Acetonitryl chromatograficznie czysty, Merck, Darmstadt, Niemcy,
- Woda destylowana i bidestylowana,
- Podłoża mikrobiologiczne: bulion Mueller-Hinton (MHB), agar z hydrolizatem kazeiny i soi (TSA), bulion z hydrolizatem kazeiny i soi (TSB).

4.3. Aparatura i sprzęt pomiarowy

Wpływ promieniowania jonizującego na wybrane antybiotyki cefalosporynowe analizowano przy użyciu następującej aparatury badawczej:

- Chromatograf cieczowy HPLC Merck Hitachi L-7200 z detektorem DAD,
- Chromatograf cieczowy UHPLC Thermo Scientific Ultimate 3000 z detektorem DAD,
- Chromatograf cieczowy Shimadzu Prominence LC 20 z detektorem UV/VIS,
- Spektrometr EPR Bruker ELEXSYS 500 (X-band),
- Spektrometr FT-IR Shimadzu IRAffinity,
- Spektrometr Ramana LabRAM HR800 (HORIBA Jobin Yvon),
- Skaningowy kalorymetr różnicowy DSC-204 (Netzsch),
- Skaningowy kalorymetr różnicowy Mettler Toledo DSC-Star 1,
- Dyfraktometr proszkowy Bruker D8 Advance,
- Dyfraktometr proszkowy Seifert HZG-4,
- Napyłarka Polaron Range SC7620 Sputter Coater,
- Skaningowy mikroskop elektronowy Hitachi S-3000N,
- Łaźnia ultradźwiękowa Branson 3510E – DTH,
- Waga analityczna KERN 770,
- pHmetr Mettler Toledo SevenCompact pH/Ion S220,
- Liniowy accelerator elektronów LAE 13/9.

4.4. Metodyka badań

Wybrane antybiotyki cefalosporynowe poddano działaniu promieniowania jonizującego w liniowym akceleratorze elektronów, a następnie przeprowadzono badania analityczne napromieniowanych leków, równoległe ze związkami nienapromieniowanymi. W pierwszym etapie użyto tzw. metod bezpośrednich czyli takich, które nie wymagają wstępnego przygotowania próbki.

Zastosowano następujące metody bezpośrednie:

- analiza wagowa,
- badania organoleptyczne w fazie stałej (postać, zabarwienie, zapach),
- spektrometrię EPR,
- spektroskopię FT-IR,
- spektroskopię Ramana,
- skaningową kalorymetrię różnicową (DSC),
- skaningową mikroskopię elektronową (SEM),
- proszkową dyfraktometrię rentgenowską (XRPD).

W kolejnym etapie badań zastosowano następujące metody pośrednie:

- badania organoleptyczne (ocena przezroczystości i zabarwienia roztworów),
- badania mikrobiologiczne,
- badania chromatograficzne (HPLC i UHPLC).

4.4.1. Przygotowanie próbek

Badane cefalosporyny odważono w ilości 0,1000 g (dla dawki promieniowania 25 kGy) i 0,0500 g (dla pozostałych dawek promieniowania) do wytarowanych fiolek z ciemnego szkła o pojemności 5 ml. Fiolki zamknięto plastikowymi korkami, opisano i ponownie zważono. Dodatkowo przygotowano próbki każdego z wybranych antybiotyków o masie 0,5000 g celem przeprowadzenia badań mikrobiologicznych.

4.4.2. Napromieniowanie

Przygotowane próbki poddano działaniu promieniowania jonizującego w temperaturze pokojowej, i atmosferze powietrza, w liniowym akceleratorze elektronów LAE 13/9 za pomocą wiązki elektronów o energii 9,96 MeV (prąd wiązki wynosił 6,2 μ A, moc źródła 10 kGy/s, a temperatura procesu $\leq 35^{\circ}\text{C}$). Badane związki napromieniowano następującymi dawkami: 25, 50, 100, 200 i 400 kGy.

4.4.3. Analiza wagowa

Próbki badanych cefalosporyn zważono na wadze analitycznej KERN 770 przed i po napromieniowaniu z dokładnością 0,0010 g. Masy próbek porównano i obliczono bezwzględną i procentową zmianę masy po napromieniowaniu.

4.4.4. Analiza organoleptyczna

Analizę organoleptyczną badanych związków przeprowadzono według zaleceń Farmakopei Polskiej X [67]. Porównano postać, zabarwienie, zapach w stanie stałym oraz przezroczystość i zabarwienie metanolowych/wodnych roztworów przed i po napromieniowaniu dawkami 25, 50, 100, 200 i 400 kGy.

4.5. Metody badań

4.5.1. Spektrometria elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR)

Badania z wykorzystaniem elektronowego rezonansu paramagnetycznego wykonano dla nienapromieniowanych i napromieniowanych cefalosporyn w fazie stałej w kapilarach kwarcowych o średnicy 4 mm firmy Wilmad. Pomiary zostały przeprowadzone w temperaturze 297 K na spektrometrze Bruker ELEXSYS 500, pracującym w pasmie X mikrofal (9,4 GHz). Badanie prowadzono od 1 do 125 dnia od napromieniowania. Widma EPR były rejestrowane jako wartości pierwszych pochodnych z absorpcji mikrofalowej. Ilość wolnych rodników w próbce została obliczona z wykorzystaniem opublikowanej wcześniej procedury [94].

4.5.2. Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR)

Na wadze torsyjnej odważono $1 \pm 0,05$ mg badanych antybiotyków cefalosporynowych (nienapromieniowanych oraz poddanych działaniu promieniowania) oraz 300 mg KBr wysuszonego uprzednio w temperaturze 600°C . Następnie obie substancje utarto w moździerzu agatowym, po czym wykonano tabletkę o wymiarach $1,3 \times 0,1$ cm przy użyciu tabletkarki PYE UNICAM. Tabletkę odniesienia wykonano z samego KBr, a następnie zarejestrowano widma w podczerwieni w zakresie od 4000 do 400 cm^{-1} , w temperaturze pokojowej na spektrofotometrze FT-IR Shimadzu IRAffinity. Pomiary przeprowadzono po upływie 3 miesięcy od napromieniowania.

4.5.3. Spektroskopia Ramana

Widma Ramana badanych cefalosporyn były rejestrowane na spektrometrze LabRAM HR800 (HORIBA Jobin Yvon). Wzbudzenie lasera wynosiło $\lambda_{\text{exc}} = 633\text{ nm}$ (laser Ne - Hesiingle bond). Aby zapobiec rozkładowi próbki, wiązka lasera była w każdym przypadku mniejsza niż 1 mW. Pomiary przeprowadzono po upływie 3 miesięcy od napromieniowania.

4.5.4. Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)

Badania kalorymetryczne wybranych cefalosporyn prowadzone były na kalorymetrach: DSC 1 Star firmy Mettler Toledo (ceftiofur sodowy, siarczan cefkwinomu i cefuroksym aksetylu) oraz DSC-204 firmy Netsch (pozostałe próbki). Próbki związków wyjściowych i napromieniowanych, odważono w ilości $5\text{ mg} \pm 10\%$, a następnie umieszczono w przekłuwanych tygielkach aluminiowych. Pomiary wykonano w atmosferze gazu obojętnego (azot) w zakresie temperatur od 20 do 300°C , przy szybkości ogrzewania $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ po upływie 2 miesięcy od napromieniowania.

4.5.5. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

W celu polepszenia kontrastu obrazu oraz minimalizacji efektu ładowania próbki badanych cefalosporyn zostały pokryte mieszaniną złota z palladem za pomocą napyłarki Polaron Range SC7620 Sputter Coater. Czas napyłania wynosił 135 sek. Następnie tak przygotowane próbki obserwowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego Hitachi S-3000N

(napięcie przyspieszające wynosiło 0,3 - 30 kV). Badanie przeprowadzono 2 tygodnie po napromieniowaniu.

4.5.6. Proszkowa dyfraktometria rentgenowska (XRPD)

Badania XRPD wybranych cefalosporyn prowadzone były na dyfraktometrach proszkowych: Seifert HZG-4 (siarczan cefoseliny) oraz Bruker D8 Advance zaopatrzone w monochromator Johanssona ($\lambda_{\text{Cu K}\alpha 1} = 1,5406\text{\AA}$) i detektor paskowy LynxEye (pozostałe antybiotyki). Próbkę związków nienapromieniowanych oraz poddanych działaniu promieniowania w dawce 400 kGy odważono w ilości 10 mg, a następnie umieszczono w kuwecie kwarcowej. Dane dyfrakcyjne były rejestrowane w zakresach: $2\theta = 4-60^\circ$ (siarczan cefoseliny) oraz $2\theta = 2-50^\circ$ (pozostałe cefalosporyny). W obu przypadkach częstotliwość pomiaru wynosiła $0,02^\circ \text{ s}^{-1}$. Badanie przeprowadzono po upływie 3 miesięcy po napromieniowaniu.

4.5.7. Badania mikrobiologiczne

Badania mikrobiologiczne były prowadzone w dwóch etapach. W pierwszym etapie dokonano oceny czystości mikrobiologicznej antybiotyków poddanych działaniu promieniowania w dawce 25 kGy, zalecanej do osiągnięcia jałowości. Następnie porównano aktywność mikrobiologiczną wybranych cefalosporyn sterylizowanych radiacyjnie oraz wyjaławianych poprzez sączenie.

Wykorzystano następujące, zalecane przez EUCAST szczepy wzorcowe:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213,
- *Escherichia coli* ATCC 25922,
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Przygotowanie zawiesiny szczepów wzorcowych

W celu przygotowania zawiesiny bakterii pobrano z hodowli muzealnej szczepu (przechowywanej w zestawie Microbank) jeden koralik i wykonano posiew na podłoże TSA. Hodowlę inkubowano 24 godziny w temperaturze $34 \pm 1^\circ\text{C}$. Po tym czasie dokonano posiewu hodowli na podłoże TSB i poddano inkubacji 18 godzin w temperaturze $34 \pm 1^\circ\text{C}$. Następnie, w zbuforowanym roztworze chlorku sodu z peptonem ($\text{pH} = 7,0$) przygotowano zawiesinę

bakterii o gęstości 0,5 w skali MacFarlanda. Gęstość zawiesiny ustalono za pomocą densytometru. W celu określenia liczby bakterii w 1 ml zawiesiny przygotowano szereg rozcieńczeń. Następnie z dwóch ostatnich rozcieńczeń pobrano po 1 ml roztworu i wysiano metodą zalewową na podłoże TSA. Po 48 godzinach inkubacji policzono kolonie na płytkach i wyznaczono wartości cfu/ml (Tabela 7).

Tabela 7. Liczba komórek (cfu/ml) w zawiesinach bakterii

Szczep wzorcowy	Rozcieńczenie zawiesiny	Wartość średnia cfu/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ⁻⁶	6,9 x 10 ⁷
<i>Escherichia coli</i>	10 ⁻⁶	8,1 x 10 ⁷
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 ⁻⁶	7,5 x 10 ⁷

Ocena jałowości antybiotyków sterylizowanych radiacyjnie

Wszystkie próbki antybiotyków wyjaławianych metodą sączenia, jak i sterylizowanych radiacyjnie, zostały przebadane w kierunku jałowości.

W tym celu próbkę antybiotyku (antybiotyk stanowił 10% objętości podłoża) wprowadzono do podłoża tioglikolanowego płynnego, które pozwala wykryć obecność bakterii beztlenowych i bakterii tlenowych oraz do podłoża bulionowego z hydrolizatem kazeiny i soi, które umożliwia wzrost grzybów i bakterii tlenowych.

Podłoża inkubowano 14 dni: podłoże tioglikolanowe w temperaturze 35°C, bulion z hydrolizatem kazeiny i soi w temperaturze 25°C. W czasie inkubacji co 24 godziny kontrolowano podłoża w kierunku pojawienia się widocznego makroskopowo wzrostu drobnoustrojów.

Porównanie aktywności mikrobiologicznej antybiotyków wyjaławianych poprzez sączenie i sterylizowanych radiacyjnie

W celu porównania aktywności mikrobiologicznej cefalosporyn wyjaławianych za pomocą sączenia oraz sterylizowanych radiacyjnie, dla każdego z antybiotyków oznaczono minimalne stężenie hamujące (MIC), czyli najmniejsze stężenie leku, wyrażone µg/ml, hamujące wzrost bakterii w badaniach *in vitro*, prowadzonych zgodnie ze standardową procedurą EUCAST.

Oznaczenie to polegało na obserwacji zmętnienia podłoża (wzrost drobnoustrojów) po określonym czasie. Badania prowadzone były w trzech powtórzeniach dla każdego antybiotyku.

4.5.8. Badania chromatograficzne (HPLC i UHPLC)

Do oceny zmian stężenia badanych cefalosporyn pod wpływem promieniowania jonizującego zastosowano metodę HPLC lub UHPLC (chlorowodrek cefetamet u piwoksylu). Metody te były opracowane i zwalidowane z przeznaczeniem do badań trwałości w roztworach wodnych i/lub w fazie stałej [80, 95-97]. Warunki rozdzielania chromatograficznego badanych cefalosporyn przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Warunki rozdzielania chromatograficznego wybranych cefalosporyn

Metoda HPLC do oceny wpływu promieniowania jonizującego na zawartość ceftiofuru sodowego [95]
Parametry rozdzielania: <ul style="list-style-type: none"> • Aparat: HPLC Shimadzu Prominence LC 20 z detektorem UV/VIS • Kolumna: Lichrospher 4,5x250 mm (5 µm) • Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi • Faz ruchoma: 0,02 mol/l roztwór wodorofosforanu disodu (pH = 6,0) – acetonitryl (78:22 V/V) • Szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,2 ml/min • Długość fali detektora UV: 292 nm • Objętość nastrzyku: 50 µl
Metoda HPLC do oceny wpływu promieniowania jonizującego na zawartość siarczanu cefkwinomu [96]
Parametry rozdzielania: <ul style="list-style-type: none"> • Aparat: HPLC Merck Hitachi L-7200 z detektorem DAD • Kolumna: Lichrospher 4,5x125 mm (5 µm) • Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi • Faz ruchoma: 0,02 mol/l roztwór wodorofosforanu disodu (pH = 7,0) – acetonitryl (90:10 V/V) • Szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,0 ml/min • Długość fali detektora UV: 268 nm • Objętość nastrzyku: 50 µl

Metoda HPLC do oceny wpływu promieniowania jonizującego na zawartość cefuroksymu aksetylu [67]

Parametry rozdzielania:

- Aparat: UHPLC Thermo Scientific Ultimate 3000 z detektorem DAD
- Kolumna: Zorbax TMS 4,6x250 mm (5 µm)
- Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami trimetylosililowymi
- Faz ruchoma: 23 g/l roztwór diwodorofosforanu amonu – metanol (62:38 V/V)
- Szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,0 ml/min
- Długość fali detektora UV: 278 nm
- Objętość nastrzyku: 20 µl

Metoda HPLC do oceny wpływu promieniowania jonizującego na zawartość siarczanu cefoseliny [80]

Parametry rozdzielania:

- Aparat: UHPLC Thermo Scientific Ultimate 3000 z detektorem DAD
- Kolumna: Lichrospher 4,5x250 mm (5 µm)
- Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi
- Faz ruchoma: 0,012 mol/l roztwór octanu amonowego – acetonitryl (95:5 V/V)
- Szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,0 ml/min
- Długość fali detektora UV: 260 nm
- Objętość nastrzyku: 50 µl

Metoda HPLC do oceny wpływu promieniowania jonizującego na zawartość dichlorowodoru cefepimu jednowodnego

Parametry rozdzielania:

- Aparat: UHPLC Thermo Scientific Ultimate 3000 z detektorem DAD
- Kolumna: Kinetex 2,1x100 mm (5 µm)
- Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi (w technologii core-shell)
- Faz ruchoma: 0,012 mol/l roztwór octanu amonowego – acetonitryl (95:5 V/V)
- Szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,0 ml/min
- Długość fali detektora UV: 254 nm
- Objętość nastrzyku: 5 µl

Metoda UHPLC do oceny wpływu promieniowania jonizującego na zawartość chlorowodoru cefetametę piwoksylu [97]

Parametry rozdzielania:

- Aparat: UHPLC Thermo Scientific Ultimate 3000 z detektorem DAD
- Kolumna: Waters Acquity BEH 2,1x100 mm (1,7 μ m)
- Faza nieruchoma: żel krzemionkowy do chromatografii z grupami oktadecylosililowymi
- Faza ruchoma: 0,1% roztwór kwasu mrówkowego – acetonitryl (60:40 V/V)
- Szybkość przepływu fazy ruchomej: 0,7 ml/min
- Długość fali detektora UV: 265 nm
- Objętość nastrzyku: 5 μ l

Walidacja metod

Zastosowane w badaniach metody HPLC dla ceftiofuru sodowego, siarczanu cefkwinomu, cefuroksymu aksetylu oraz siarczanu cefoseliny były uprzednio zwalidowane, dlatego aby potwierdzić możliwość ich wykorzystania do badań wpływu promieniowania jonizującego na trwałość wybranych związków, metody te poddano rewalidacji uwzględniając parametr selektywności. W tym celu przygotowano próbki badanych cefalosporyn przed i po napromieniowaniu o stężeniu 0,2 mg/ml w wodzie lub w mieszaninie acetonitryl-woda (50:50 V/V).

W przypadku dichlorowodoru cefepimu jednowodnego oraz chlorowodoru cefetametę piwoksylu opracowano metody chromatograficzne (HPLC dla CFP i UHPLC dla CFE) i przeprowadzono ich walidację w zakresie:

- selektywności,
- liniowości,
- precyzji pośredniej i bezpośredniej,
- dokładności,
- limity wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ).

Metodykę walidacji opracowanych metod chromatograficznych przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Walidacja metod chromatograficznych do oceny trwałości dichlorowodorku cefepimu jednowodnego oraz chlorowodorku cefetamet u piwoksylu pod wpływem promieniowania

Metoda HPLC do oceny wpływu promieniowania jonizującego na zawartość dichlorowodorku cefepimu jednowodnego (CFP)	Metoda UHPLC do oceny wpływu promieniowania jonizującego na zawartość chlorowodorku cefetamet u piwoksylu (CFE)
Selektywność	
W celu określenia selektywności opracowanych metod chromatograficznych przygotowano próbki CFP oraz CFE (przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy), a następnie sporządzono ich wodne roztwory o stężeniu 0,2 mg/ml.	
Liniowość	
<p>Zależności $P_i=f(c)$ dla badanych cefalosporyn wyznaczono w wodzie. Przygotowano po 12 roztworów o stężeniu od 0,01 mg/ml do 0,24 mg/ml. Na kolumnę wprowadzono po 5 μl każdego z roztworów i zarejestrowano chromatogramy. Każdy nastrzyk powtarzano trzykrotnie. Wykonano wykres $P_i=f(c)$ (Tabele 16 i 17, ryciny 48 i 49) gdzie:</p> <p>P_i – pole powierzchni pik u CFP/CFE, c – stężenie CFE/CFP [mg/ml]</p>	
Precyzja	
Celem określenia precyzji bezpośredniej opracowanych metod wykonano po 6 oznaczeń roztworów badanych cefalosporyn o stężeniach: 0,16 mg/ml; 0,20 mg/ml; 0,24 mg/ml co odpowiada 80, 100 i 120% stężenia nominalnego CFP i CFE w czasie badań trwałości. Przygotowane roztwory przechowywano w temperaturze 5°C bez dostępu światła przez 2 dni, a następnie wykonano po 6 oznaczeń każdego z nich.	
Dokładność	
Dokładność opracowanych metod analitycznych została określona na trzech poziomach stężeń: 0,16 mg/ml; 0,20 mg/ml; 0,24 mg/ml, co odpowiada 80, 100 i 120% stężenia nominalnego badanych cefalosporyn w trakcie badań trwałości. W tym celu dokonano oceny odzysku CFP i CFE z placebo (talku). Wykonano po 6 oznaczeń dla każdego stężenia.	
Granica detekcji i oznaczalności	
<p>Granice detekcji (DL) i oznaczalności (QL) dla CFP i CFE obliczono z następujących wzorów:</p> $DL = 3,3 \cdot S_y/a$ $QL = 10 \cdot S_y/a$ <p>gdzie: S_y – odchylenie standardowe, a – nachylenie krzywej kalibracji</p>	

Wyznaczanie parametrów kinetycznych rozkładu wybranych cefalosporyn po ekspozycji na promieniowanie jonizujące

Odważono dokładnie po 5,0 mg badanych cefalosporyn nie poddanych działaniu promieniowania oraz napromieniowanych dawkami 25, 50, 100, 200 i 400 kGy. Przygotowane próbki rozpuszczono w wodzie/mieszaniu acetonitryl-woda (50:50 V/V), otrzymując roztwory o stężeniu 0,2 mg/ml, a następnie wprowadzono na kolumny chromatograficzne i rejestrowano wielkości pików substancji badanych. Jednocześnie na podstawie danych na temat mocy źródła (10 kGy/s) obliczono czas procesu absorpcji każdej z dawek promieniowania, który wynosił odpowiednio:

- 2,5 s dla dawki 25 kGy,
- 5 s dla dawki 50 kGy,
- 10 s dla dawki 100 kGy,
- 20 s dla dawki 200 kGy,
- 40 s dla dawki 400 kGy.

Następnie, wykorzystując zmiany stężenia substratu względem czasu wyznaczono stałe szybkości rozkładu $k [s^{-1}]$ i czasy rozkładu 10 i 50% substratu ($t_{0,1}$ oraz $t_{0,5}$).

Założono, że badane cefalosporyny pod wpływem promieniowania jonizującego ulegają rozkładowi zgodnie z modelem kinetyki pierwszego rzędu, co opisuje równanie:

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

gdzie P_i i P_0 – pole powierzchni pików badanego związku w czasie $t = 0$ i t

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

Dla każdej prostej metodą najmniejszych kwadratów wyznaczono następujące parametry kinetyczne równań $y = ax + b$, opisujące rozkład badanych związków pod wpływem promieniowania:

- $a \pm \Delta a, b \pm \Delta b$,
- błąd standardowy S_a ,

-
- współczynnik korelacji liniowej r .

Wartości Δa i Δb oznaczono dla $f = n-2$ stopni swobody i $\alpha = 0,05$. Do obliczeń zależności matematycznych wykorzystano arkusz kalkulacyjny Excel.

Okresy półtrwania ($t_{0,5}$) i czasy rozkładu 10% każdej z badanych cefalosporyn ($t_{0,1}$) obliczono korzystając z następujących wzorów:

$$t_{0,5} = \frac{0,693}{k}$$

$$t_{0,1} = \frac{0,1054}{k}$$

5. Wyniki

5.1. Analiza wagowa

Próbki wybranych do badań związków zostały zważone przed i po napromieniowaniu, zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 4.4.3. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Wyniki pomiarów masy badanych cefalosporyn przed i po napromieniowaniu

	Dawka [kGy]	Masa substancji		Różnica masy	
		Przed napromieniowaniem [g]	Po napromieniowaniu [g]	Bezwzględna [g]	Względna [%]
CFT	25	0,1000	0,0992	-0,0008	-0,8000
	50	0,0501	0,0496	-0,0005	-0,9980
	100	0,0501	0,0494	-0,0007	-1,3972
	200	0,0500	0,0498	-0,0002	-0,4000
	400	0,0500	0,0495	-0,0005	-1,0000
CFK	25	0,1001	0,0999	-0,0002	-0,1998
	50	0,0500	0,0498	-0,0002	-0,4000
	100	0,0502	0,0498	-0,0004	-0,7968
	200	0,0500	0,0498	-0,0002	-0,4000
	400	0,0501	0,0500	-0,0001	-0,1996
CAA	25	0,1000	0,0995	-0,0005	-0,5000
	50	0,0503	0,0495	-0,0008	-1,5905
	100	0,0502	0,0497	-0,0005	-0,9960
	200	0,0499	0,0491	-0,0008	-1,6032
	400	0,0501	0,0492	-0,0009	-1,7964

	Dawka [kGy]	Masa substancji		Różnica masy	
		Przed napromieniowaniem [g]	Po napromieniowaniu [g]	Bezwzględna [g]	Względna [%]
CAK	25	0,1000	0,0992	-0,0008	-0,8000
	50	0,0499	0,0498	-0,0001	-0,2004
	100	0,0501	0,0496	-0,0005	-0,9980
	200	0,0502	0,0497	-0,0005	-0,9960
	400	0,0500	0,0501	-0,0001	-0,2000
CSS	25	0,1000	0,0993	-0,0007	-0,7000
	50	0,0499	0,0498	-0,0001	-0,2004
	100	0,0500	0,0496	-0,0004	-0,8000
	200	0,0500	0,0497	-0,0003	-0,6000
	400	0,0500	0,0500	0,0000	0,0000
CFP	25	0,1002	0,0994	-0,0008	-0,7984
	50	0,0498	0,0499	-0,0001	-0,2008
	100	0,0501	0,0497	-0,0004	-0,7984
	200	0,0500	0,0496	-0,0004	-0,8000
	400	0,0502	0,0500	-0,0002	-0,3984
CFE	25	0,1001	0,0992	-0,0009	-0,8991
	50	0,0499	0,0497	-0,0002	-0,4008
	100	0,0501	0,0499	-0,0002	-0,3992
	200	0,0501	0,0494	-0,0007	-1,3972
	400	0,0500	0,0499	-0,0001	-0,2000

Największe względne różnice masy zostały zaobserwowane dla następujących próbek:

- ceftiofuru sodowego napromieniowanego dawką 100 kGy,
- cefuroksymu aksetylu w postaci amoficznej napromieniowanego dawkami 50, 200 i 400 kGy,
- chlorowodoru cefetametu piwoksylu napromieniowanego dawką 200 kGy.

5.2. Analiza organoleptyczna

Badania organoleptyczne wybranych cefalosporyn wykonano zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 4.4.4. Porównano postać, zabarwienie i zapach w stanie stałym oraz przezroczystość i zabarwienie wodnych roztworów, przed i po napromieniowaniu. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Wyniki analizy organoleptycznej wybranych cefalosporyn przed i po napromieniowaniu

	Parametr	Dawka [kGy]					
		0	25	50	100	200	400
CFT	Zabarwienie	biały	bardzo jasnożółty	jasnożółty	żółty	intensywnie żółty	
	Postać	bezpociowy proszek					
	Zapach	-					
	Zabarwienie i przezroczystość roztworów	przezroczysty, bezbarwny					
CFK	Zabarwienie	bardzo jasnożółty	jasnożółty			żółty	
	Postać	krystaliczny proszek					
	Zapach	+					
	Zabarwienie i przezroczystość roztworów	przezroczysty, bezbarwny					

	Parametr	Dawka [kGy]					
		0	25	50	100	200	400
CAA	Zabarwienie	biały	bardzo jasnożółty	jasnożółty		żółty	intensywnie żółty
	Postać	bezpostaciowy proszek					
	Zapach	-					
	Zabarwienie i przezroczystość roztworów	przezroczysty, bezbarwny					
CAK	Zabarwienie	biały	bardzo jasnożółty	jasnożółty		żółty	
	Postać	krystaliczny proszek					
	Zapach	-					
	Zabarwienie i przezroczystość roztworów	przezroczysty, bezbarwny					
CSS	Zabarwienie	biały	jasnożółty	żółty		intensywnie żółty	
	Postać	krystaliczny proszek					
	Zapach	-					
	Zabarwienie i przezroczystość roztworów	bezbarwny, przezroczysty					
CFP	Zabarwienie	biały	jasnożółty		żółty	intensywnie żółty	
	Postać	krystaliczny proszek					
	Zapach	-					
	Zabarwienie i przezroczystość roztworów	bezbarwny, przezroczysty					

	Parametr	Dawka [kGy]					
		0	25	50	100	200	400
CFE	Zabarwienie	biały			jasnożółty		żółty
	Postać	krystaliczny proszek					
	Zapach	-					
	Zabarwienie i przezroczystość roztworów	bezbarwny, przezroczysty					

5.3. Spektrometria elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR)

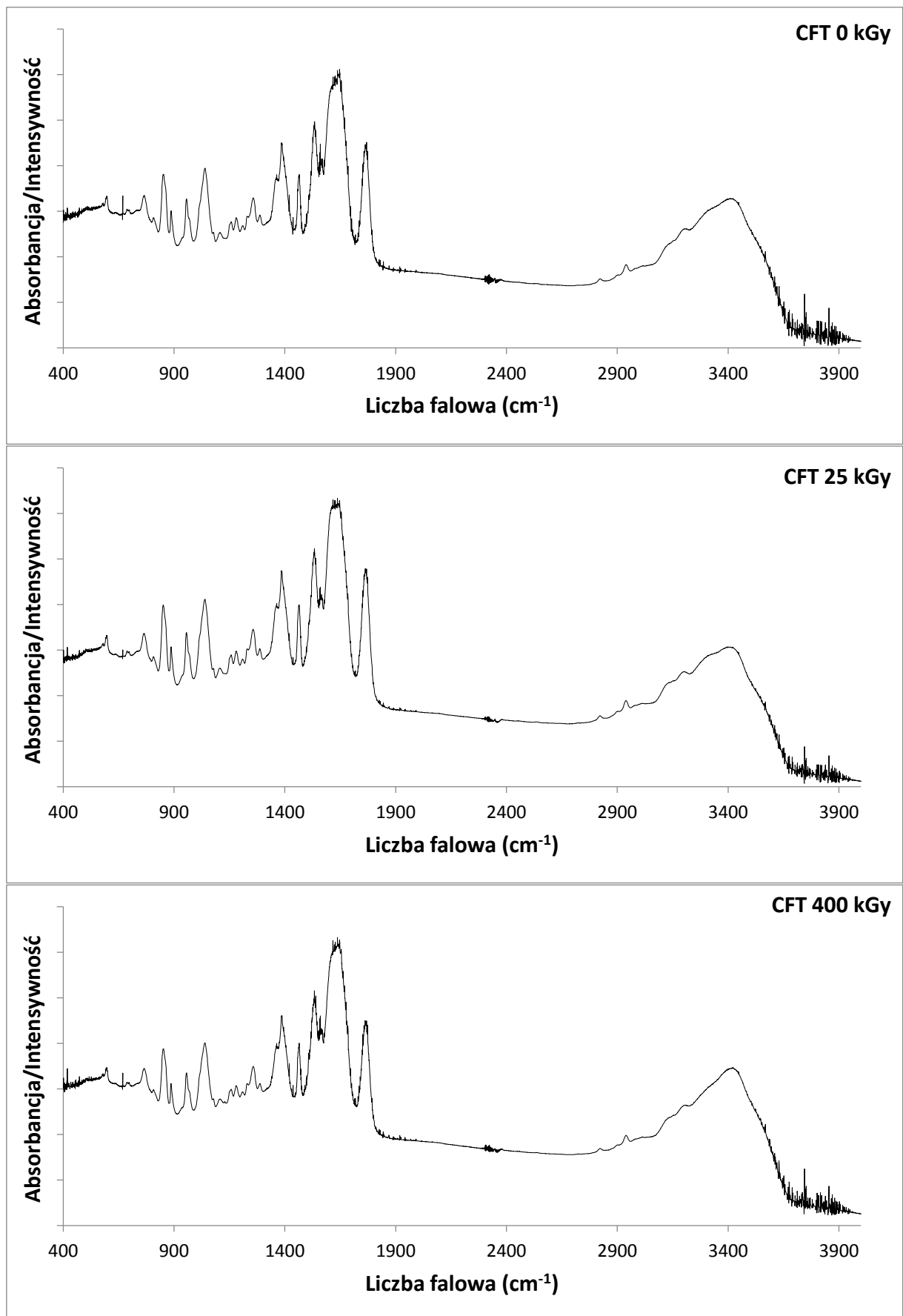
Analizę EPR przeprowadzono w oparciu o metodykę zawartą w rozdziale 4.5.1. Stwierdzono, że z wyjątkiem dichlorowodoru cefepimu jednowodnego (CFP), próbki związków nienapromieniowanych nie posiadają wolnych rodników (ich stężenie jest niższe niż czułość spektrometru, czyli 0,01 ppm). Dla wyjściowej próbki CFP stężenie wolnych rodników wynosiło 0,7 ppm. Dzięki pomiarom ilościowym możliwe było obliczenie początkowego stężenia wolnych rodników w napromieniowanych próbkach. Wyniki przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Wyniki analizy EPR wybranych cefalosporyn poddanych działaniu promieniowania

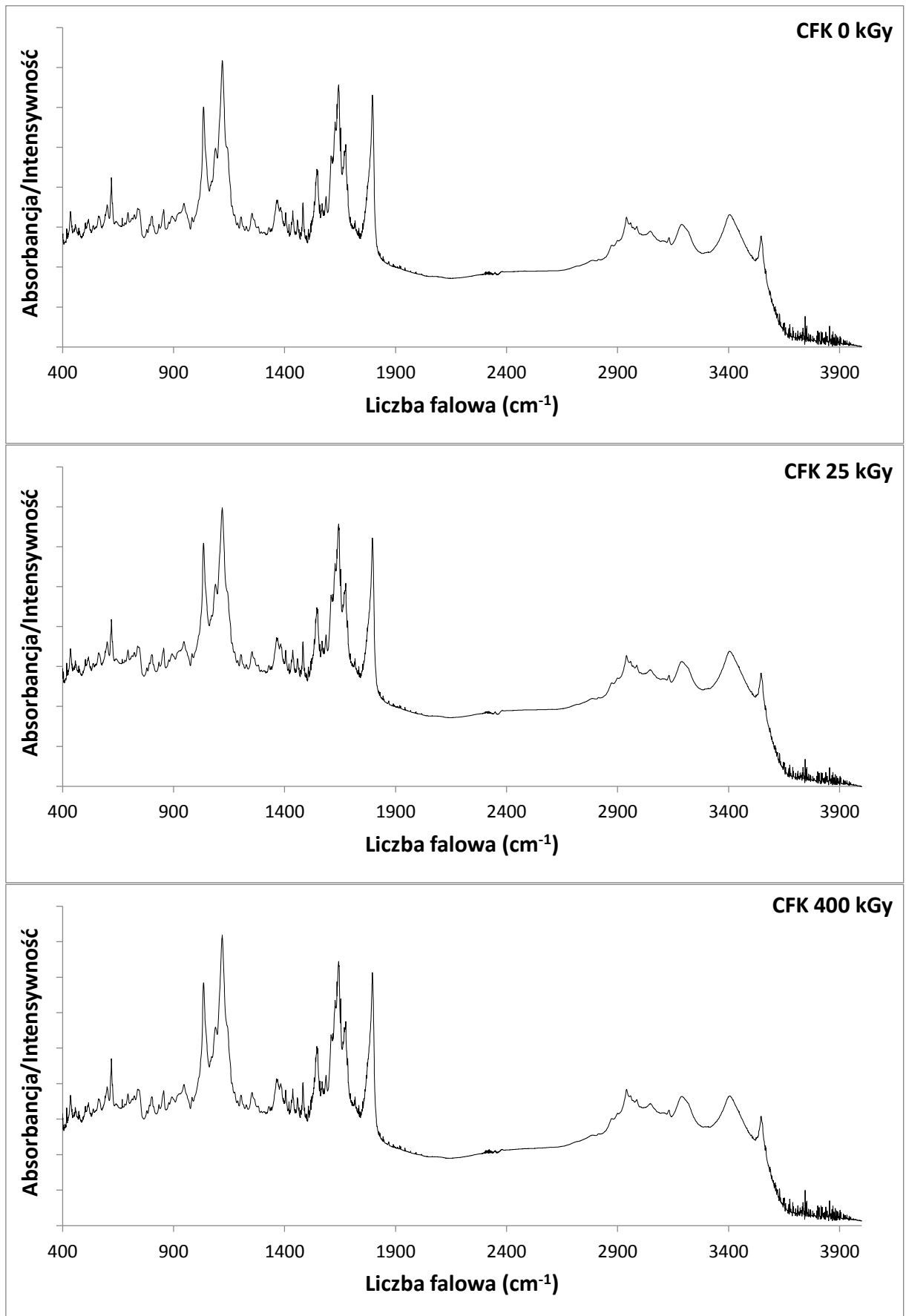
Próbka	Ilość wolnych rodników [10^{15} spin/g]	Czas życia wolnych rodników [dni]
CFT	41,3	7,2
CFK	75,7	14,8
CAA	3,54	8,0
CAK	3,06	16,0
CSS	14,7	25,8
CFP	110,6	2,0
CFE	38,1	12,9

5.4. Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR)

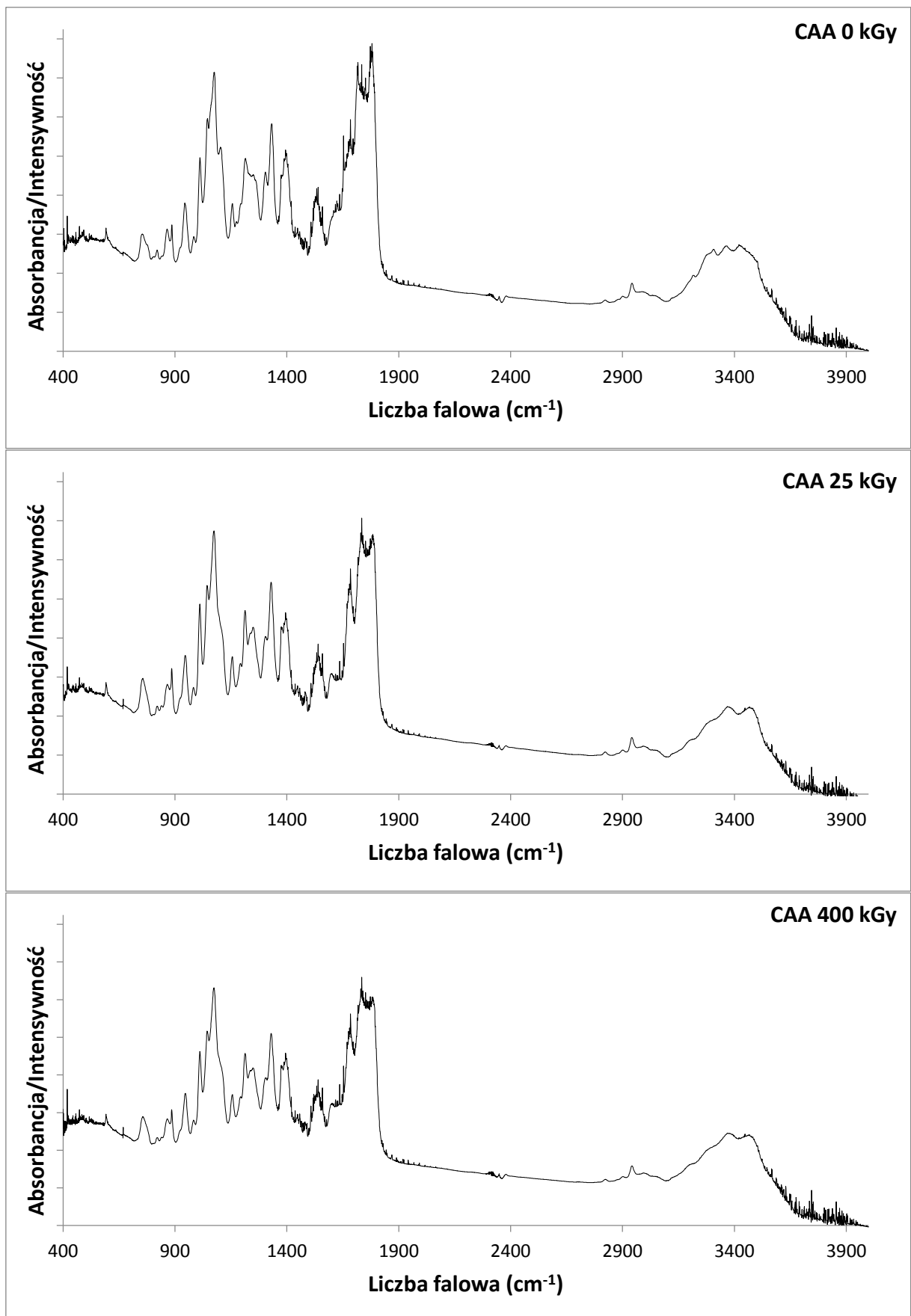
Badania spektroskopowe w podczerwieni (FT-IR) wykonano zgodnie z metodyką przedstawioną w rozdziale 4.5.2. Analizę FT-IR przeprowadzono dla związków nienapromieniowanych, jak również dla próbek poddanych działaniu promieniowania w dawkach 25 i 400 kGy. Następnie porównano zarejestrowane widma wybranych cefalosporyn przed i po napromieniowaniu. Wyniki analizy FT-IR przedstawiono na rycinach 6-12.



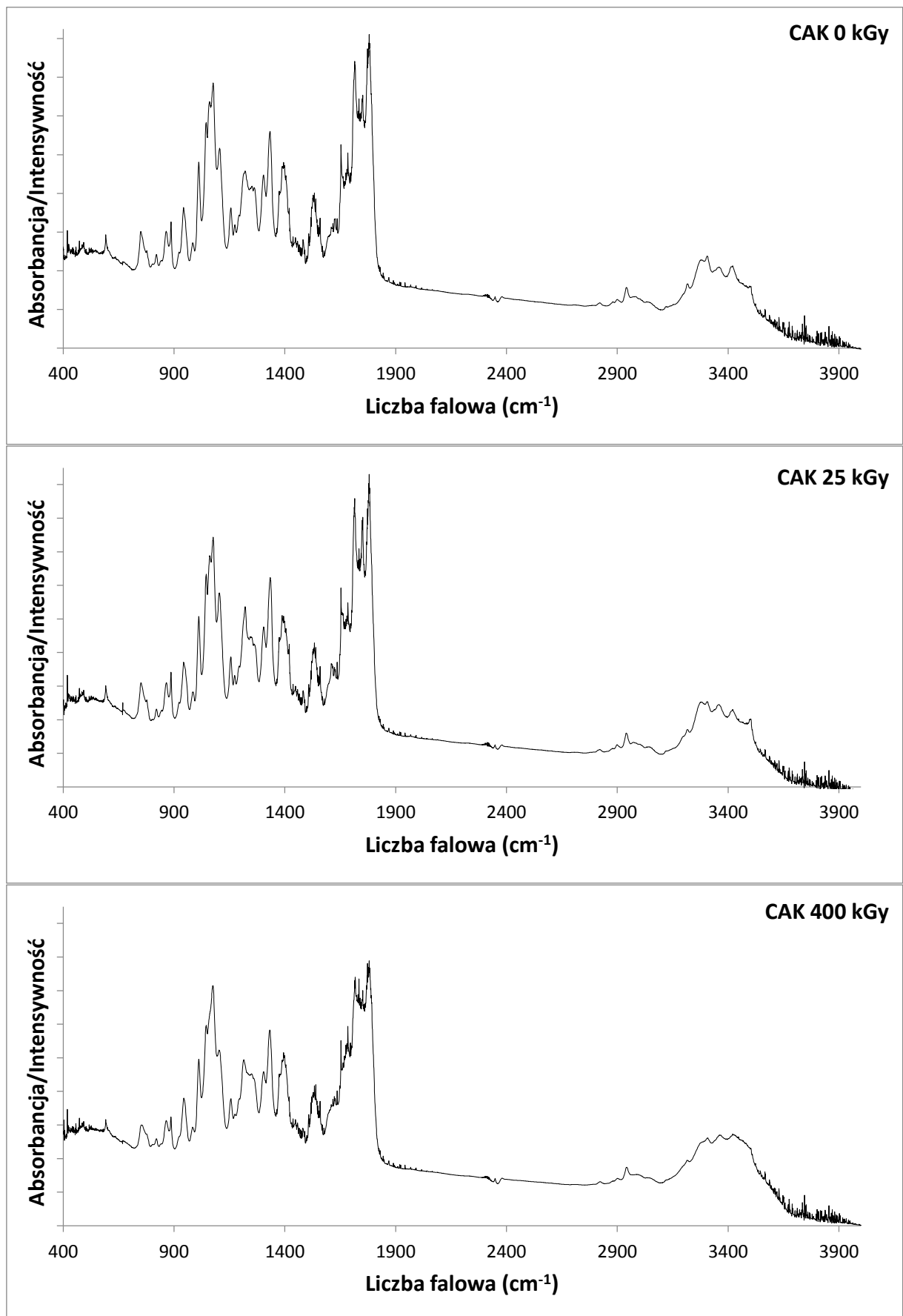
Ryc. 6. Widma FT-IR ceftiofuru sodowego przed i po napromieniowaniu.



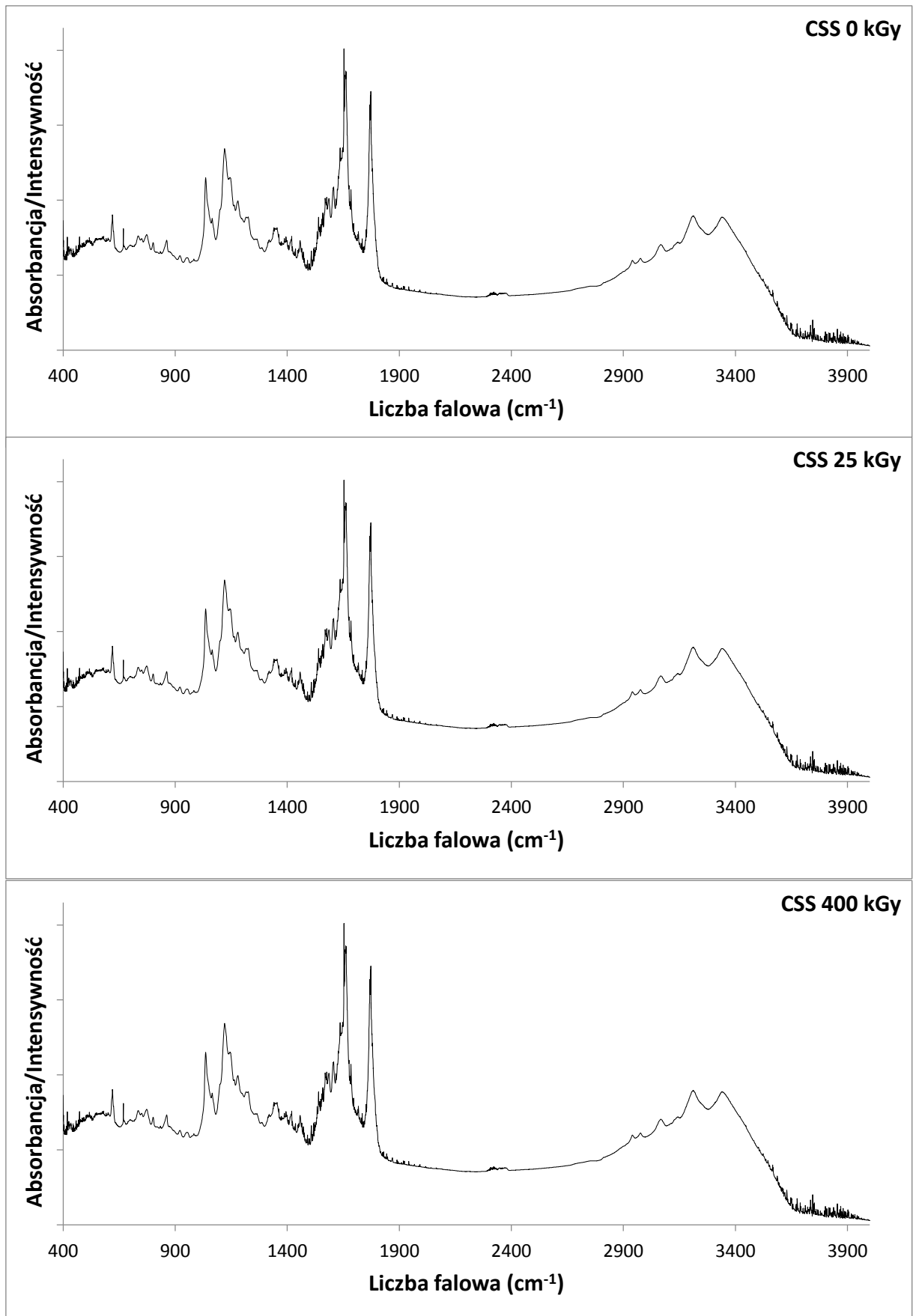
Ryc.7. Widma FT-IR siarczanu cefkwinoemu przed i po napromieniowaniu.



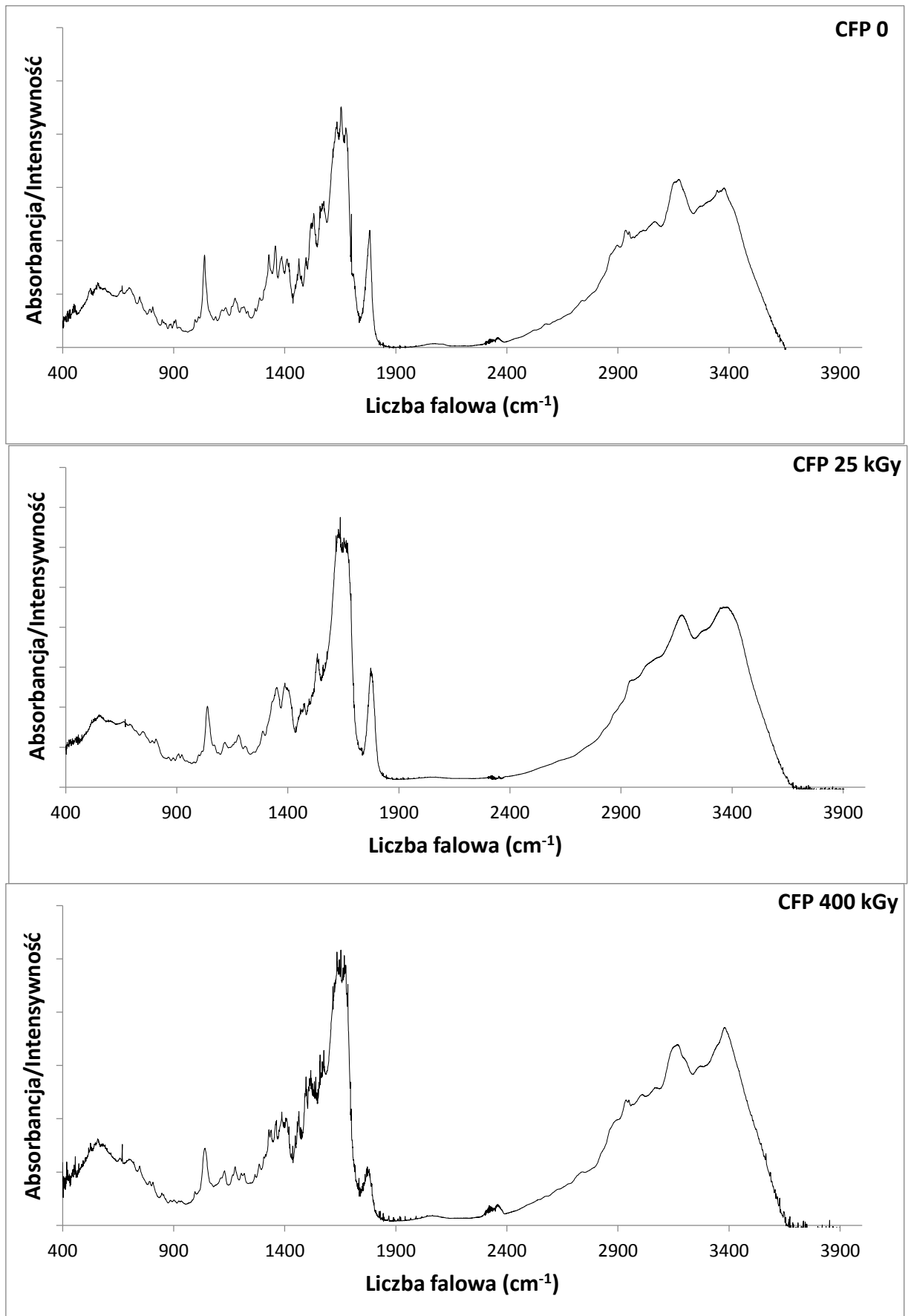
Ryc. 8. Widma FT-IR cefuroksymu aksetylu (postać amorficzna) przed i po napromieniowaniu.



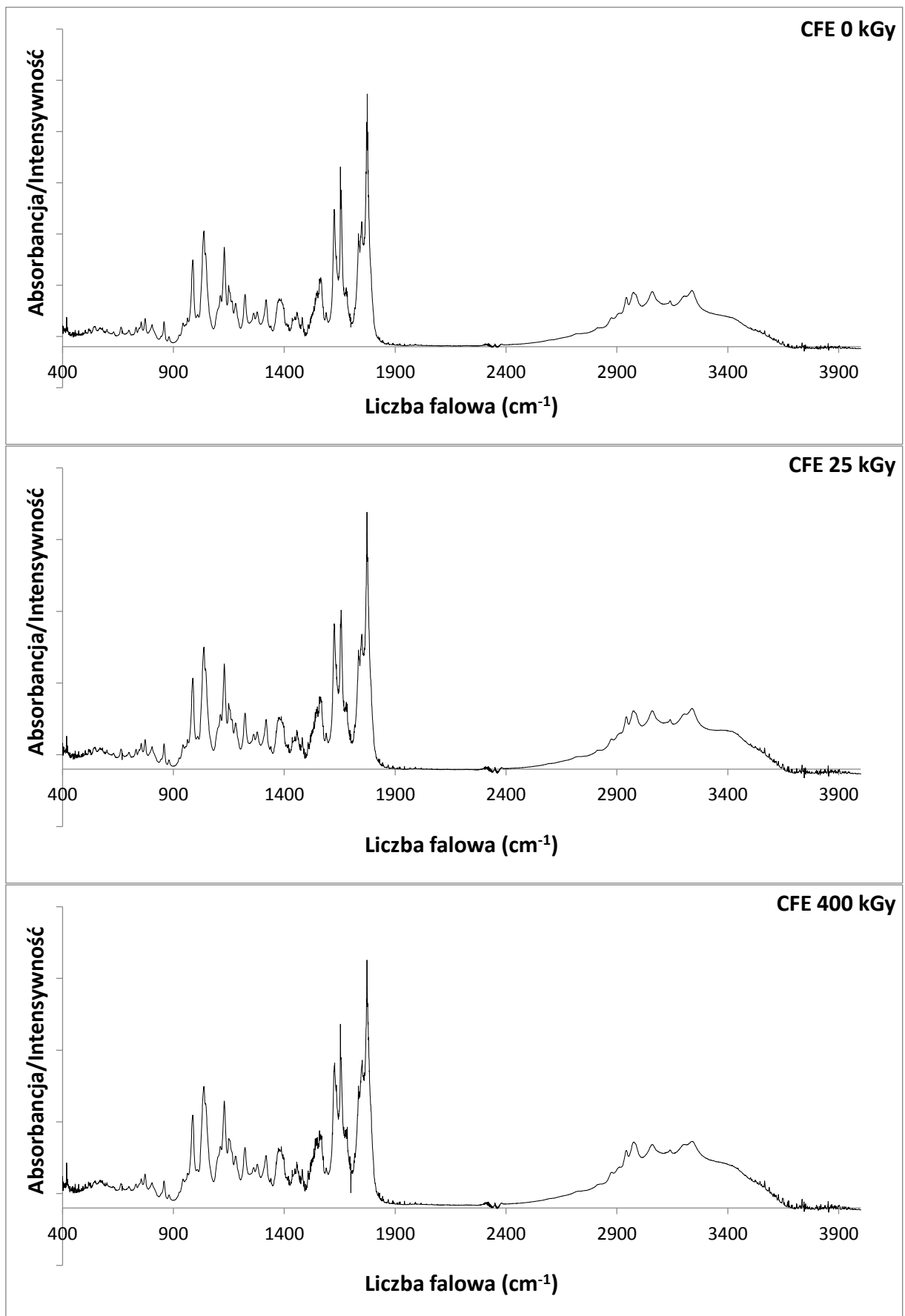
Ryc. 9. Widma FT-IR cefuroksymu aksetylu (postać krystaliczna) przed i po napromieniowaniu.



Ryc. 10. Widma FT-IR siarczanu cefoseliny przed i po napromieniowaniu.



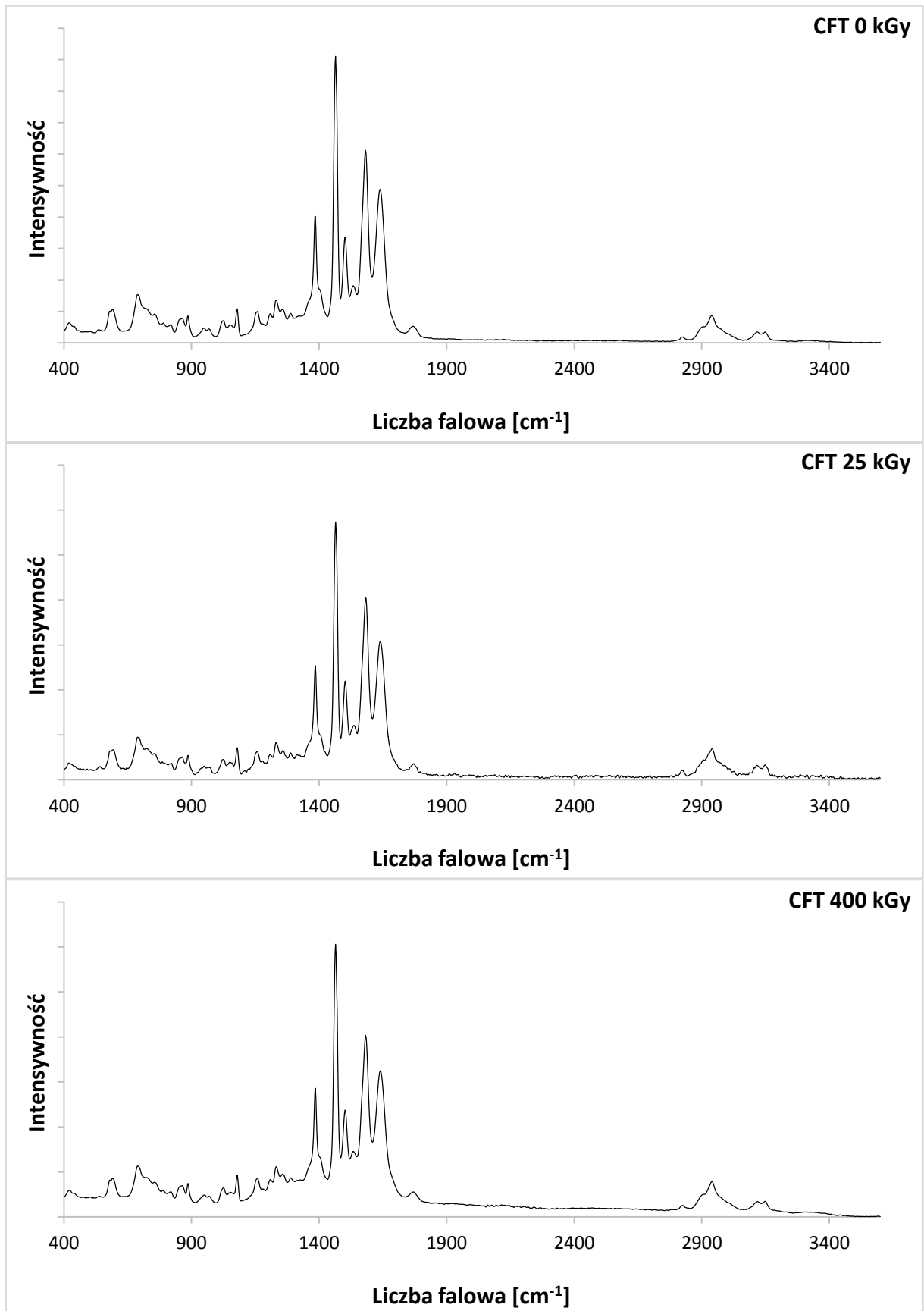
Ryc. 11. Widma FT-IR dichlorowodorku cefepimu jednowodnego przed i po napromieniowaniu.



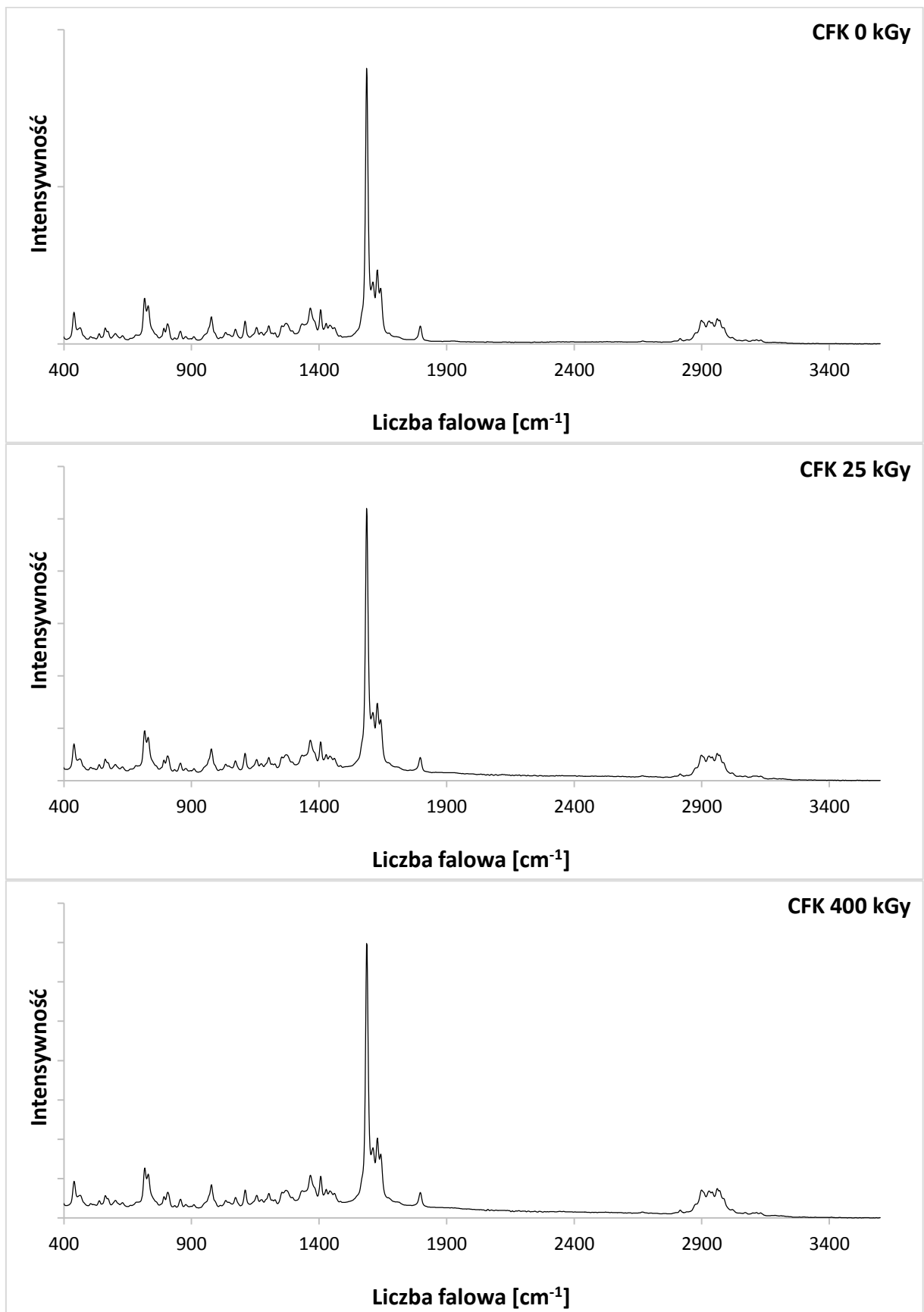
Ryc. 12. Widma FT-IR chlorowodorku cefetamet pivoksyłu przed i po napromieniowaniu.

5.5. Spektroskopia Ramana

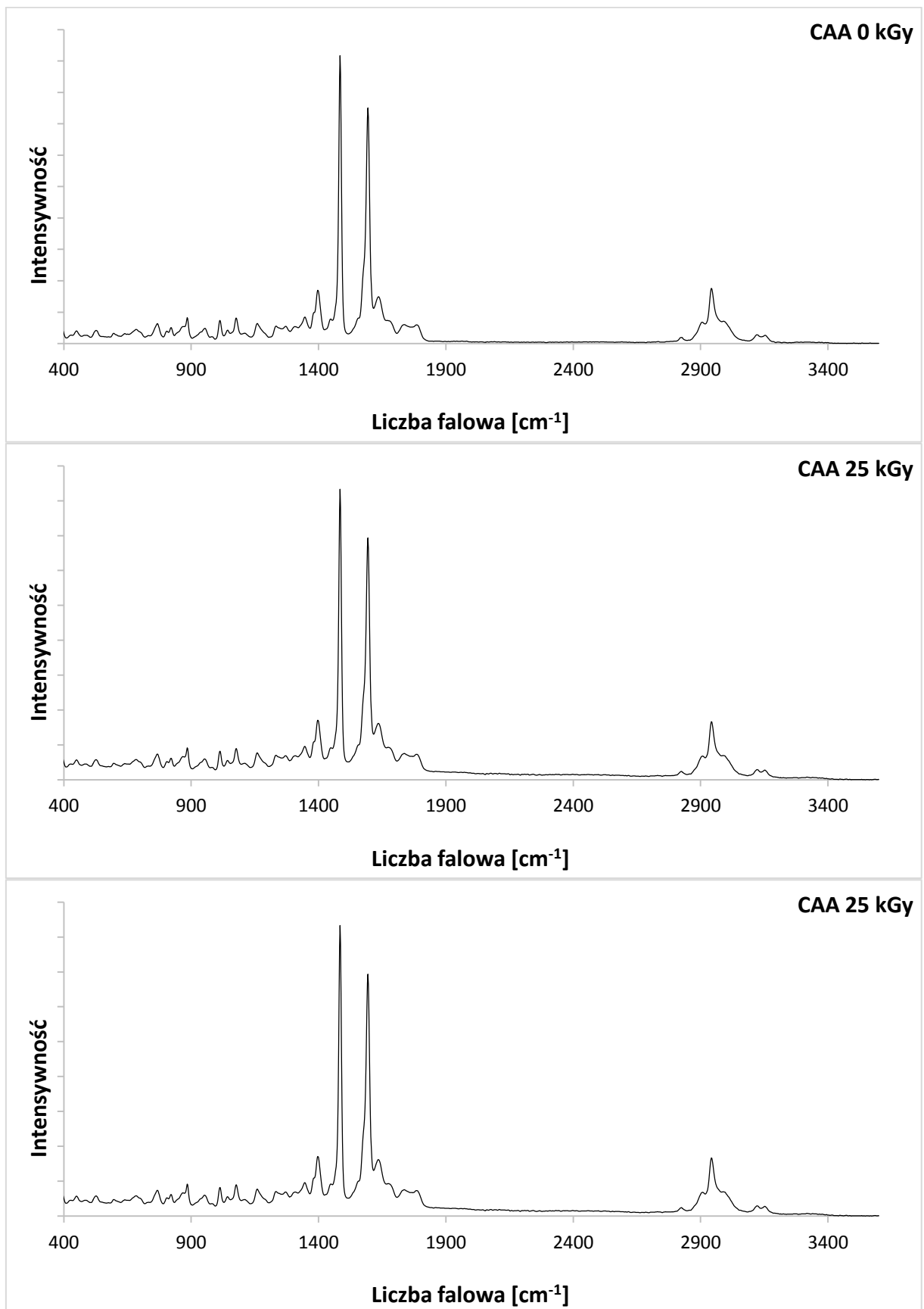
Widma Ramana wybranych antybiotyków cefalosporynowych (przed i po napromieniowaniu dawkami 25 i 400 kGy) zarejestrowano zgodnie z metodyką zamieszczoną w rozdziale 4.5.3. Dokonano analizy porównawczej widm Ramana związków wyjściowych z widmami próbek poddanych działaniu promieniowania. Otrzymane wyniki przedstawiono na rycinach 13-19.



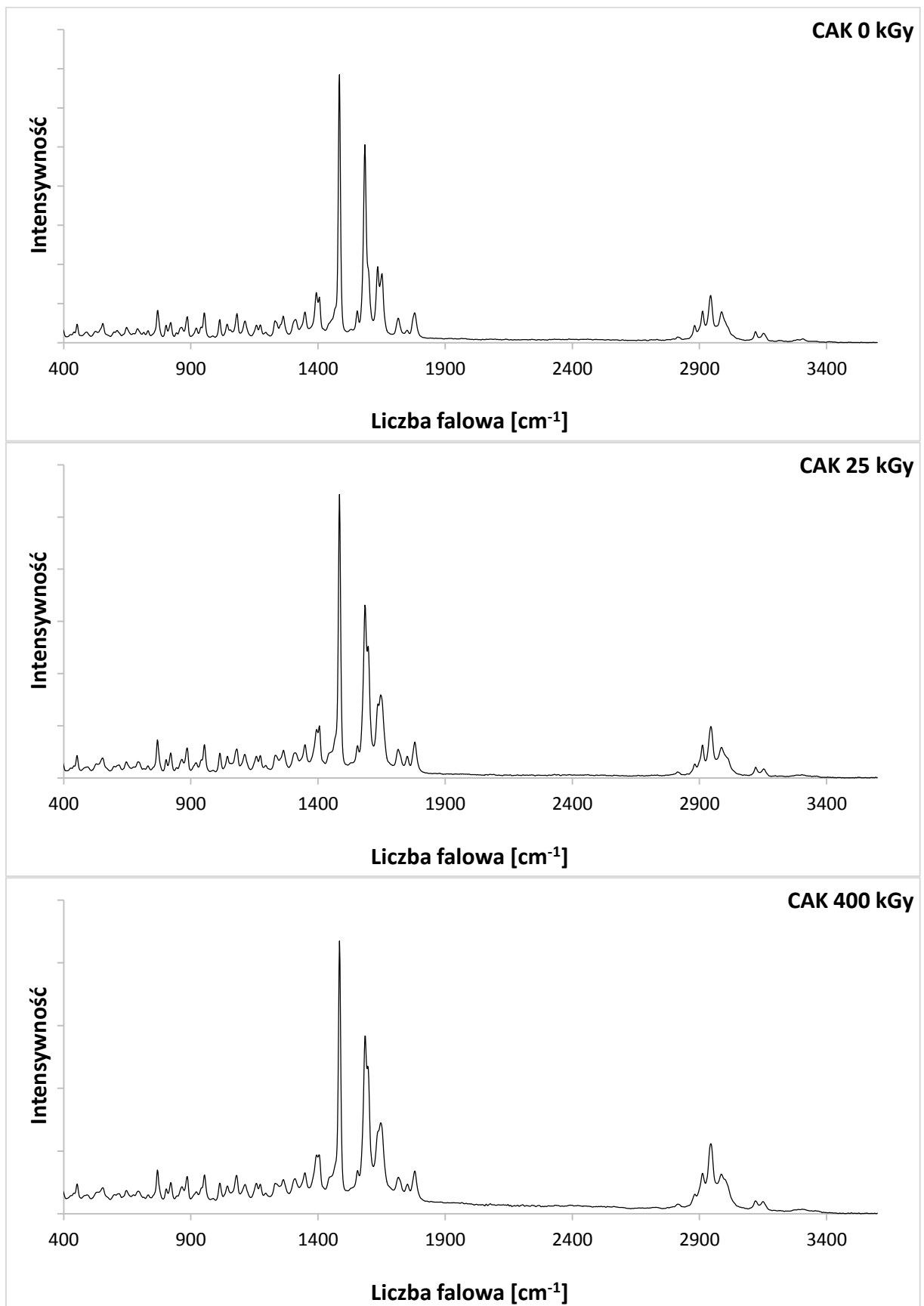
Ryc. 13. Widma Ramana ceftiofuru sodowego przed i po napromieniowaniu.



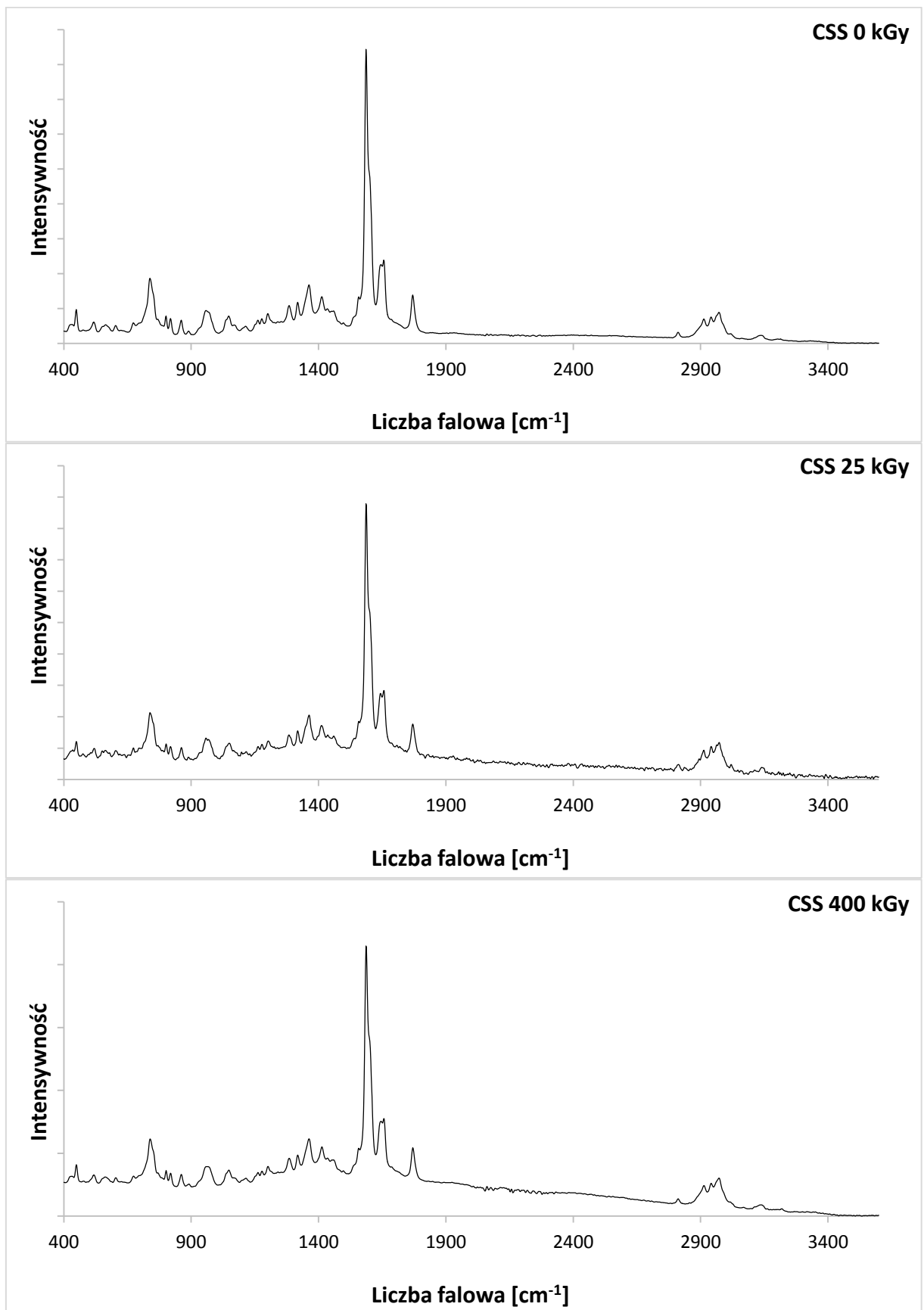
Ryc. 14. Widma Ramana siarczanu cefkwinoemu przed i po napromieniowaniu.



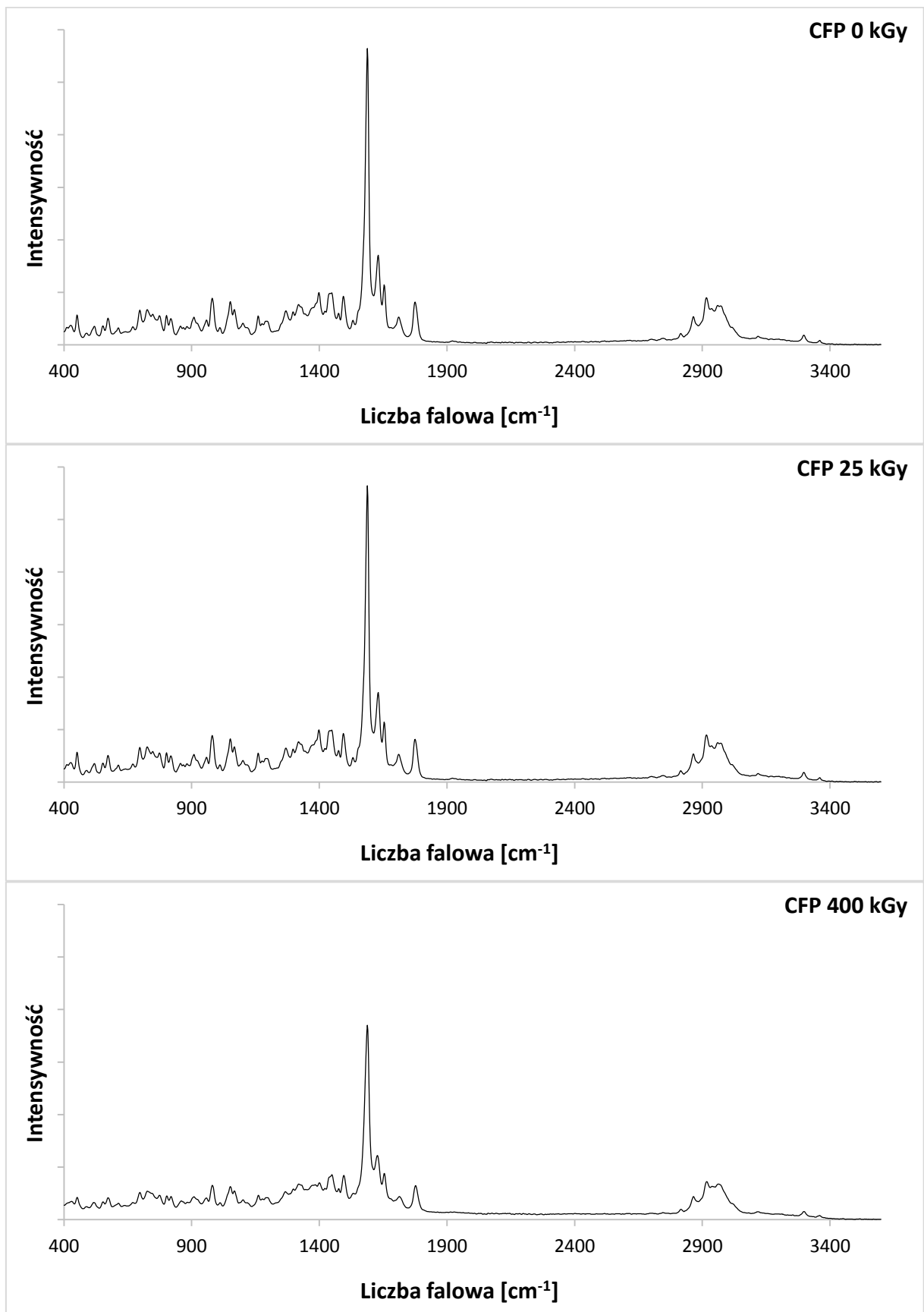
Ryc. 15. Widma Ramana cefuroksymu aksetylu (postać amorficzna) przed i po napromieniowaniu.



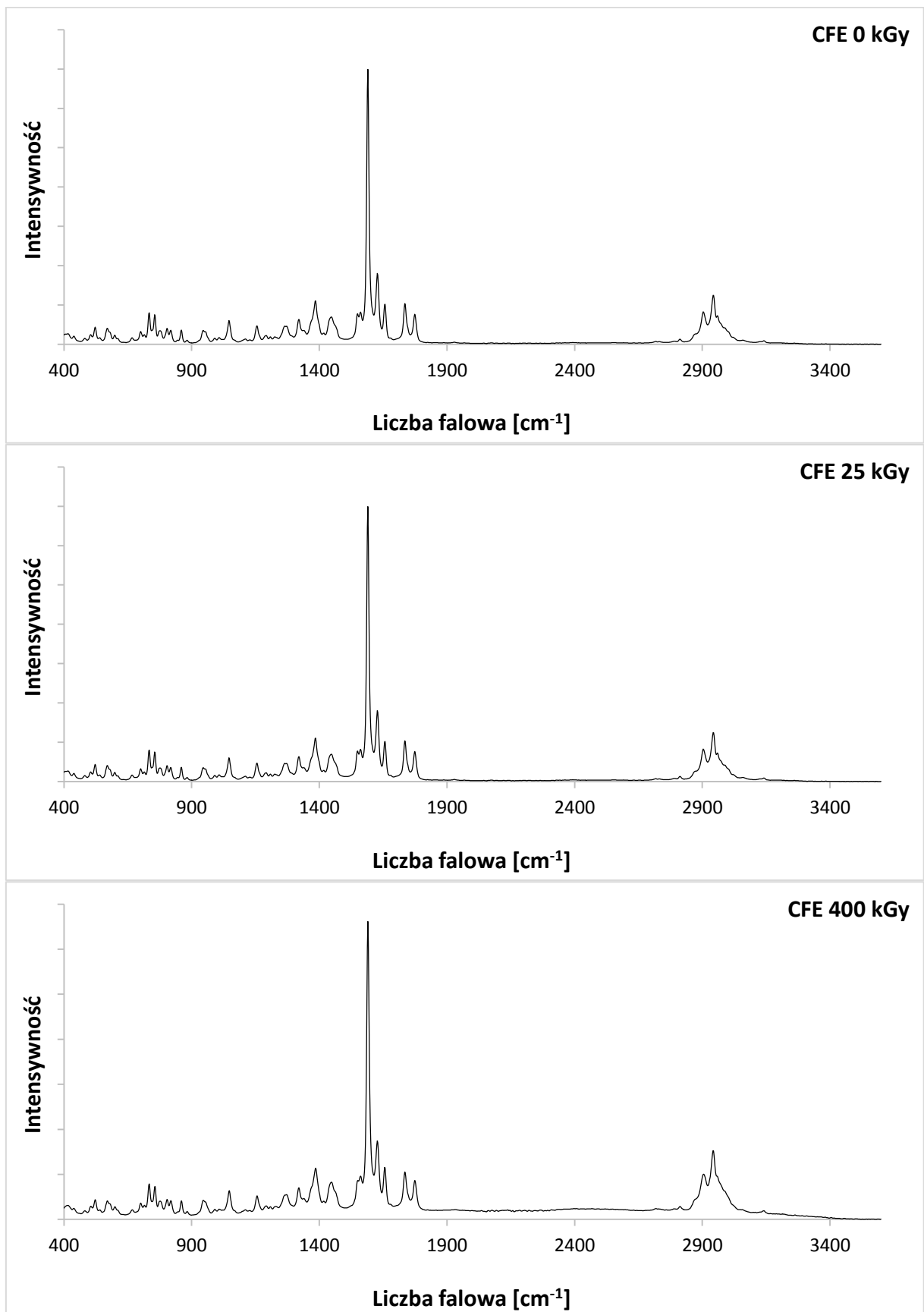
Ryc. 16. Widma Ramana cefuroksymu aksetylu (postać krystaliczna) przed i po napromieniowaniu.



Ryc. 17. Widma Ramana siarczanu cefoseliny przed i po napromieniowaniu.



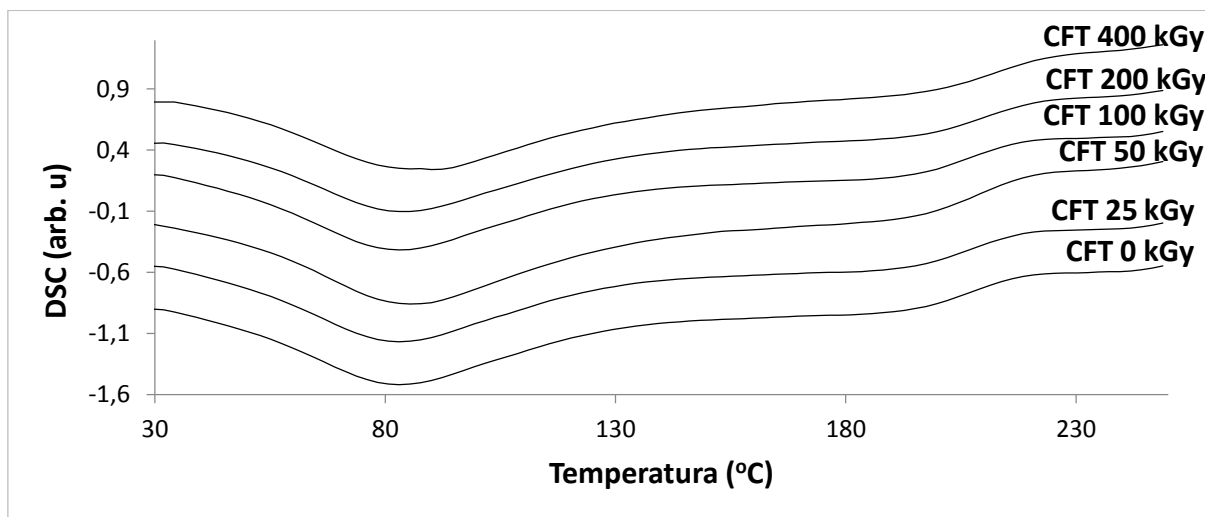
Ryc. 18. Widma Ramana dichlorowodorku cefepimu jednowodnego przed i po napromieniowaniu.



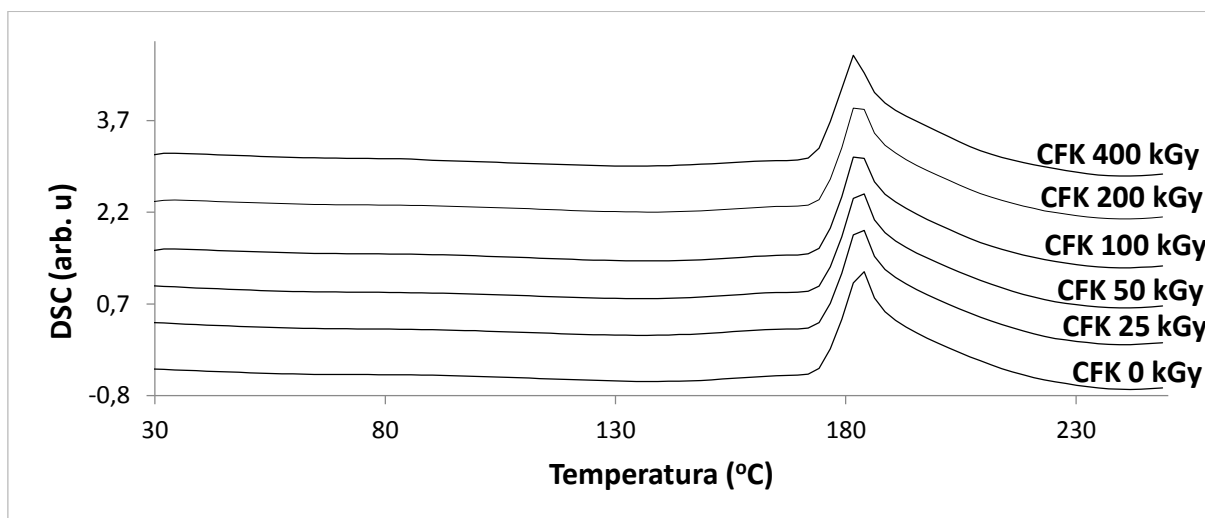
Ryc. 19. Widma Ramana chlorowodoru cefetamet u pivoksyłu przed i po napromieniowaniu.

5.6. Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)

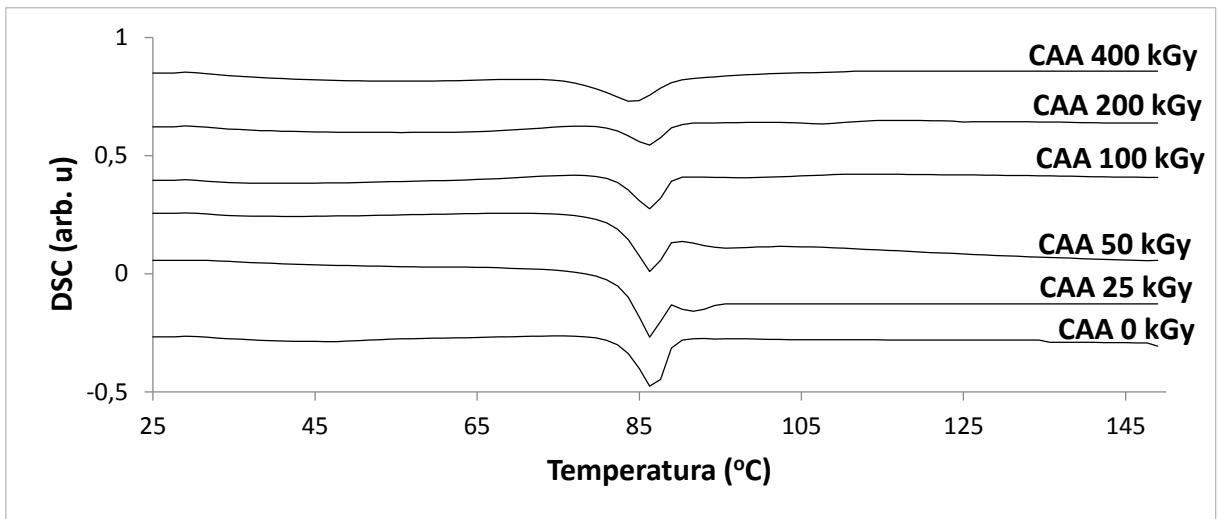
Analizę DSC wybranych cefalosporyn przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 4.5.4. Zarejestrowane krzywe badanych antybiotyków przed i po napromieniowaniu przedstawiono na rycinach 20-26, a uzyskane parametry pików ich topnienia (oprócz siarczanu cefkwinomu) zestawiono w tabelach 13 i 14.



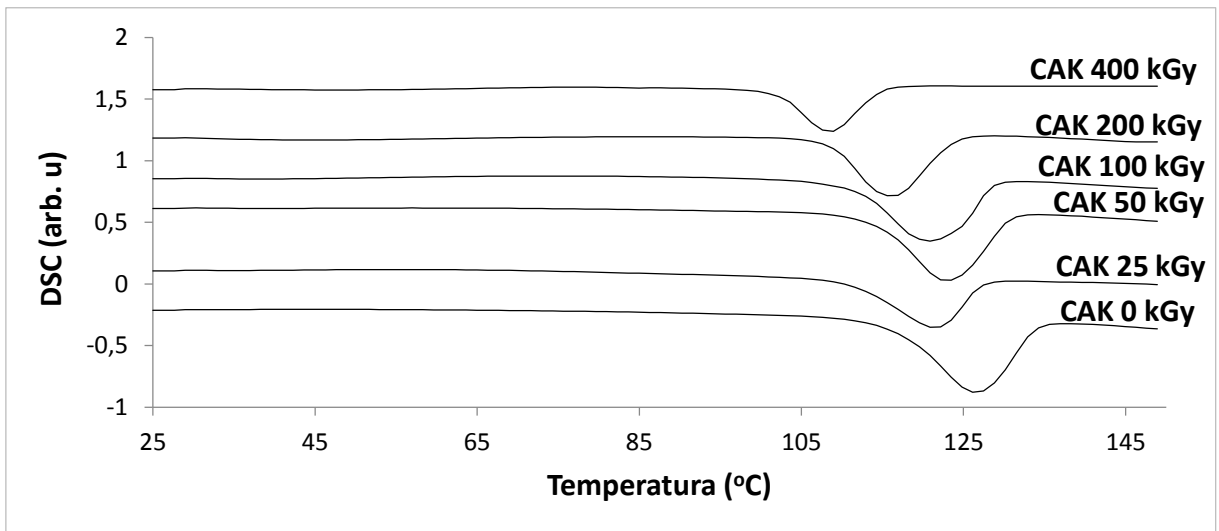
Ryc.20. Krzywe DSC ceftiofuru sodowego przed i po napromieniowaniu.



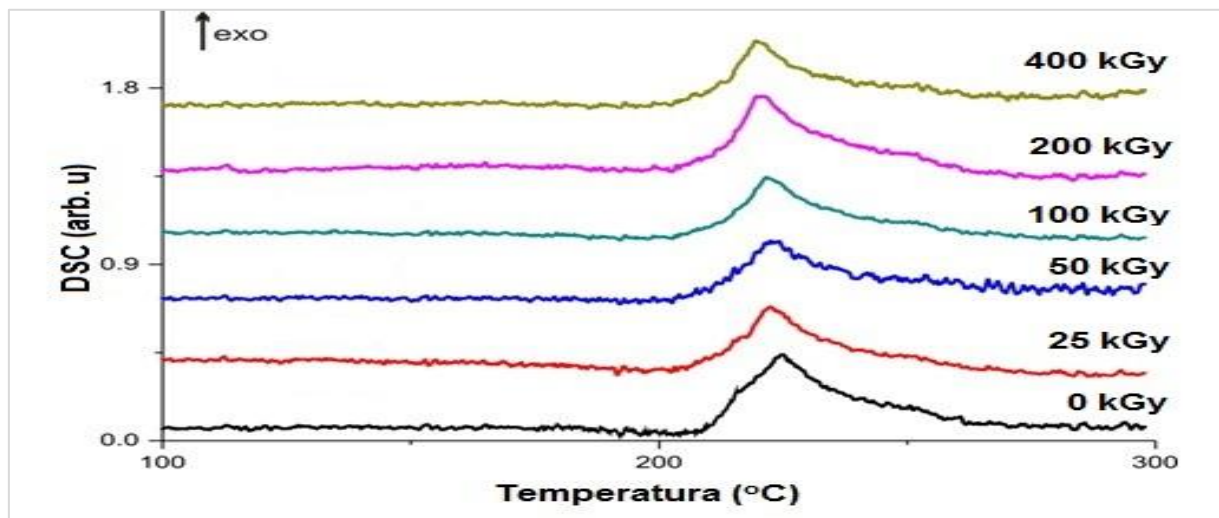
Ryc.21. Krzywe DSC siarczanu cefkwinomu przed i po napromieniowaniu.



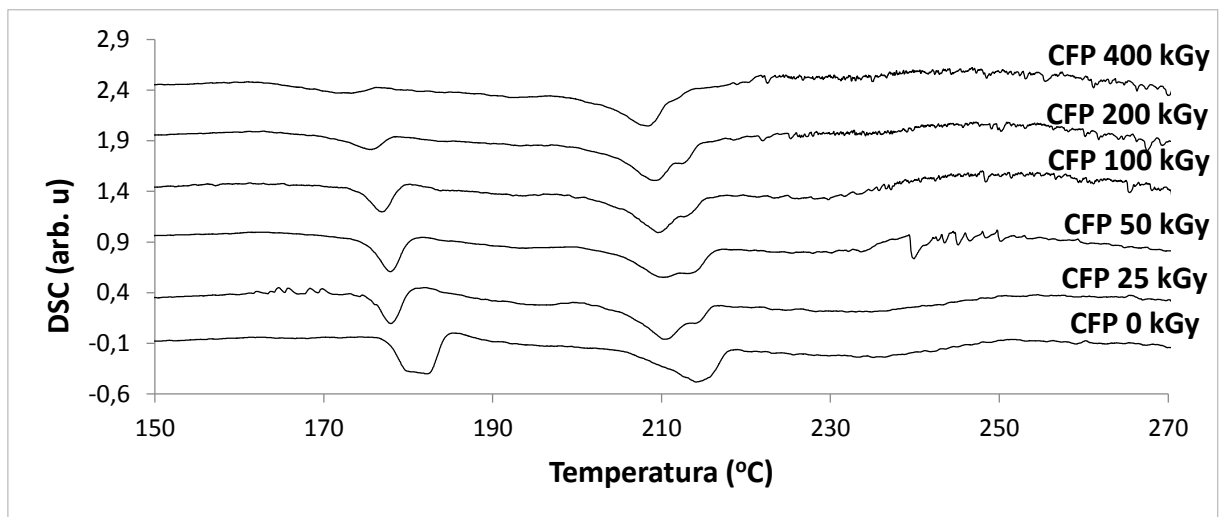
Ryc.22. Krzywe DSC cefuroksymu aksetylu (postać amorficzna) przed i po napromieniowaniu.



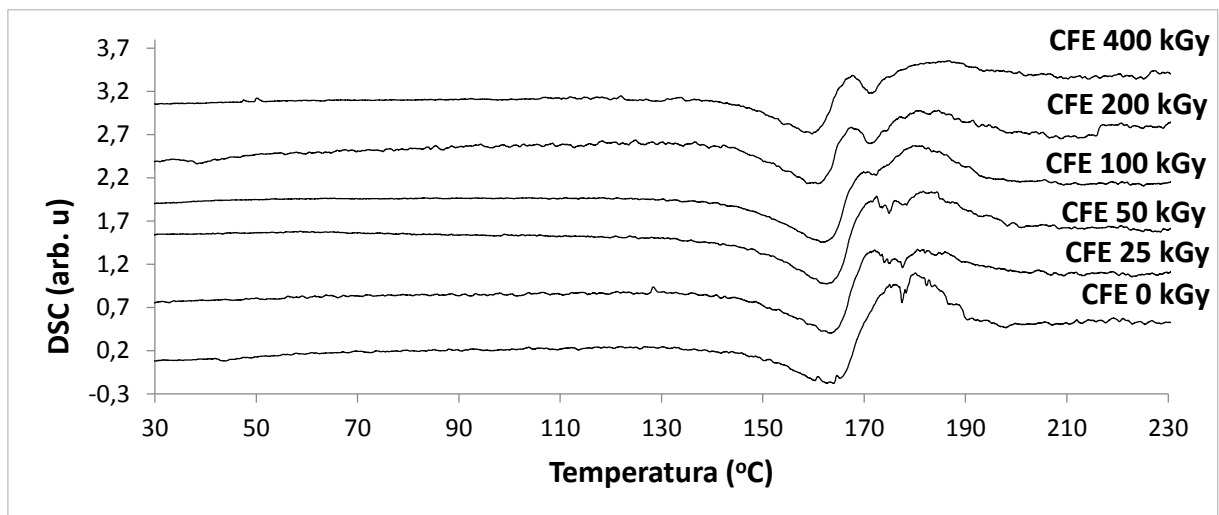
Ryc.23. Krzywe DSC cefuroksymu aksetylu (postać krystaliczna) przed i po napromieniowaniu.



Ryc.24. Krzywe DSC siarczanu cefoseliny przed i po napromieniowaniu.



Ryc.25. Krzywe DSC dichlorowodoru cefepimu jednowodnego przed i po napromieniowaniu.



Ryc.26. Krzywe DSC chlorowodoru cefetamet u piwoksylu przed i po napromieniowaniu.

Tabela 13. Zestawienie wyników analizy DSC dla CFT, CAA, CAK, CSS i CFE przed i po napromieniowaniu ($\Delta T_{\text{onset}} = T_{\text{onset x kGy}} - T_{\text{onset 0 kGy}}$; $\Delta T_{\text{peak}} = T_{\text{peak x kGy}} - T_{\text{peak 0 kGy}}$)

Związek	Dawka [kGy]	Temp. topn. [°C]				Entalpia [J/g]	
		T_{onset}	T_{peak}	ΔT_{onset}	ΔT_{peak}	ΔH	$\Delta H - \Delta H_0 \text{ kGy}$
CFT	0	47,6	84,3	-	-	-973,1	-
	25	44,8	83,0	-2,8	-1,3	-904,7	68,4
	50	44,7	85,0	-2,9	0,7	-1031,4	-58,3
	100	37,4	82,6	-10,2	-2,0	-1049,5	-76,4
	200	36,0	83,4	-11,6	-0,9	-885,0	88,1
	400	32,0	89,5	-15,6	5,2	-955,3	17,8
CAA	0	82,8	86,8	-	-	- 5,2	-
	25	83,2	86,5	0,4	- 0,3	- 3,6	1,6
	50	82,9	86,5	0,1	- 0,3	- 3,5	1,7
	100	82,1	86,3	- 0,7	- 0,5	- 3,6	1,6
	200	81,3	86,1	- 1,5	- 0,7	- 2,3	2,9
	400	77,5	84,1	- 5,3	- 2,7	- 4,3	0,9
CAK	0	116,8	126,6	-	-	- 37,7	-
	25	111,2	121,5	- 5,6	- 5,1	- 22,8	14,9
	50	114,2	122,8	- 2,6	- 3,8	- 34,8	2,9
	100	118,8	120,7	2,0	- 5,9	- 34,0	3,7
	200	108,6	116,0	- 8,2	- 10,8	- 28,1	9,6
	400	102,4	108,4	- 14,4	- 18,2	- 16,9	20,8
CSS	0	208,8	224,3	-	-	111,8	-
	25	208,5	223,4	- 0,3	- 0,9	110,9	- 0,9
	50	209,0	222,4	0,2	- 1,9	108,4	- 3,4
	100	209,1	221,6	0,3	- 2,7	107,3	- 4,5
	200	208,8	219,7	0	- 4,6	108,1	- 3,7
	400	208,6	219,5	-0,2	-4,8	106,2	-5,6

CFE	0	148,5	163,6	-	-	-74,3	-
	25	148,6	163,3	0,1	-0,3	-67,3	-7,0
	50	148,7	162,7	0,2	-0,9	-72,0	-2,3
	100	147,2	161,7	-1,3	-1,9	-72,1	-2,2
	200	140,9	160,8	-7,6	-2,8	-70,7	-3,6
	400	142,8	159,7	-5,7	-3,9	-54,4	-19,9

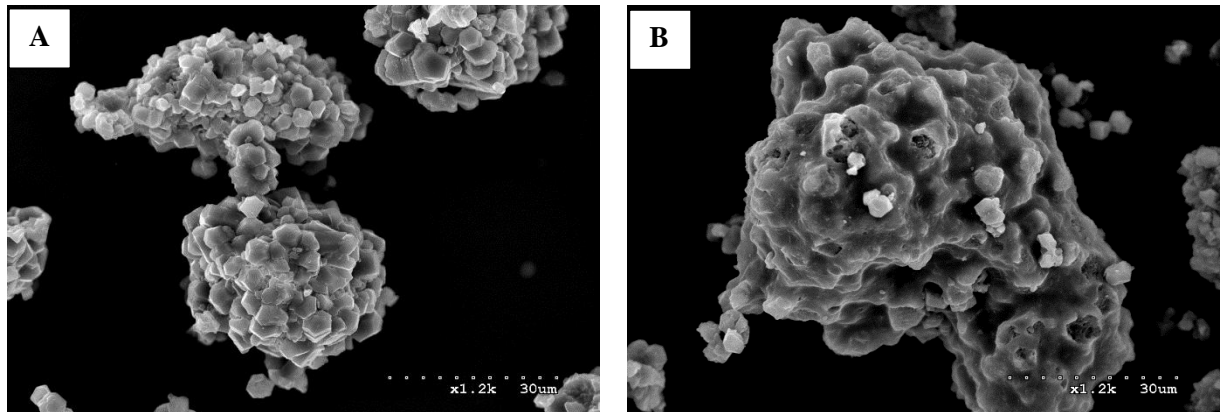
Tabela 14. Zestawienie wyników analizy DSC dla CFP przed i po napromieniowaniu ($\Delta T_{\text{onset}} = T_{\text{onset } x \text{ kGy}} - T_{\text{onset } 0 \text{ kGy}}$; $\Delta T_{\text{peak}} = T_{\text{peak } x \text{ kGy}} - T_{\text{peak } 0 \text{ kGy}}$)

			Dawka [kGy]					
			0	25	50	100	200	400
Temp. topn. [°C]	T_{onset}	p_(I)	177,6	175,6	175,1	174,1	171,0	161,0
		p_(II)	207,1	206,6	205,5	205,4	204,9	202,7
	T_{peak}	p_(I)	182,2	177,9	177,8	175,6	175,4	172,2
		p_(II)	214,1	210,3	210,1	209,3	209,1	208,3
	ΔT_{onset}	p_(I)	-	-2,0	-2,5	-3,5	-3,6	-16,6
		p_(II)	-	-0,5	-1,6	-1,7	-2,2	-5,0
	ΔT_{peak}	p_(I)	-	-4,3	-4,4	-6,6	-6,8	-10,0
		p_(II)	-	-3,8	-4,0	-4,8	-5,0	-5,8
Entalpia [J/g]	ΔH	p_(I)	-23,6	-13,7	-14,7	-11,7	-8,9	-6,1
		p_(II)	-27,4	-26,9	-28,4	-31,8	-33,8	-29,6
	ΔH - ΔH_{0 kGy}	p_(I)	-	9,9	8,9	11,9	14,7	17,5
		p_(II)	-	0,5	-1,0	-4,4	-7,4	-2,2

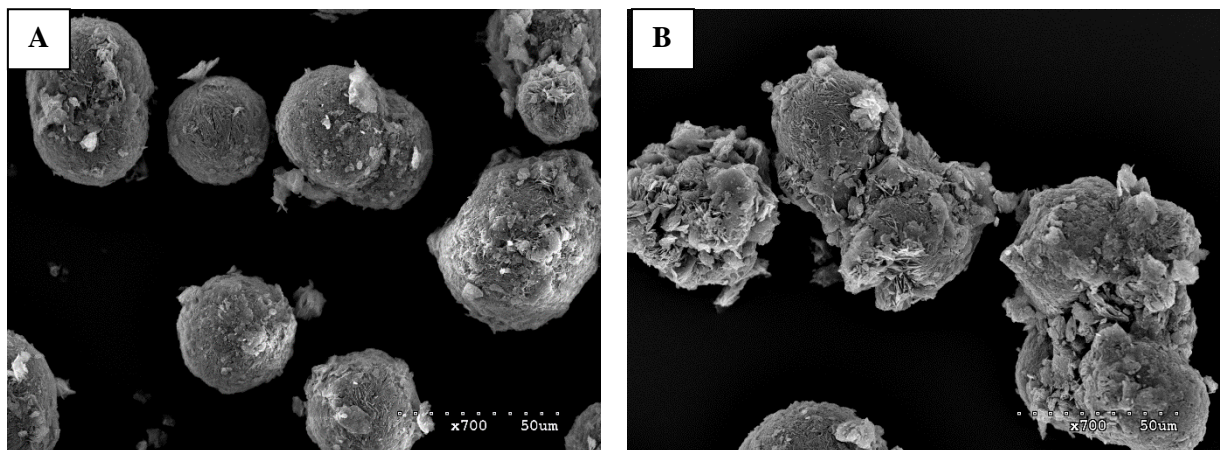
Legenda: p_(I) – pik I (dichlorowodorek cefepimu jednowodny), p_(II) – pik II (L-arginina)

5.7. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

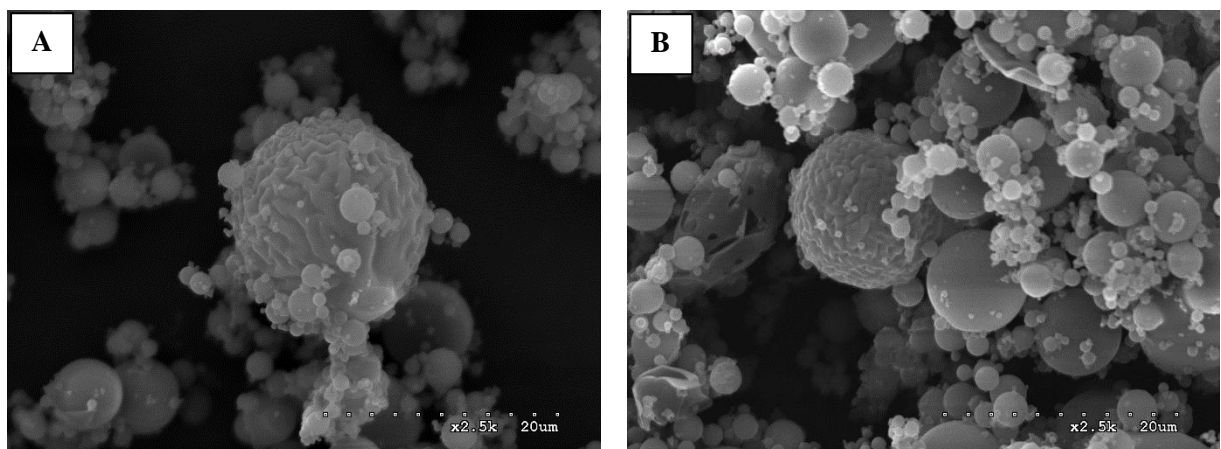
Badania mikroskopowe wybranych cefalosporyn przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 4.5.5. Mikrofotografie SEM badanych antybiotyków przedstawiono na rycinach 27-33.



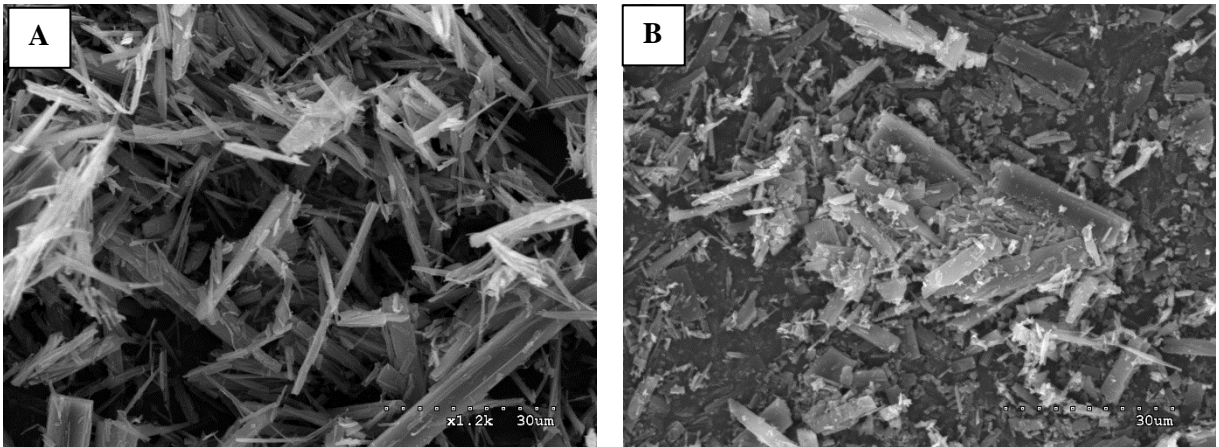
Ryc. 27. Mikrofotografie SEM dla CFT przed (A) i po napromieniowaniu (B) dawką 400 kGy.



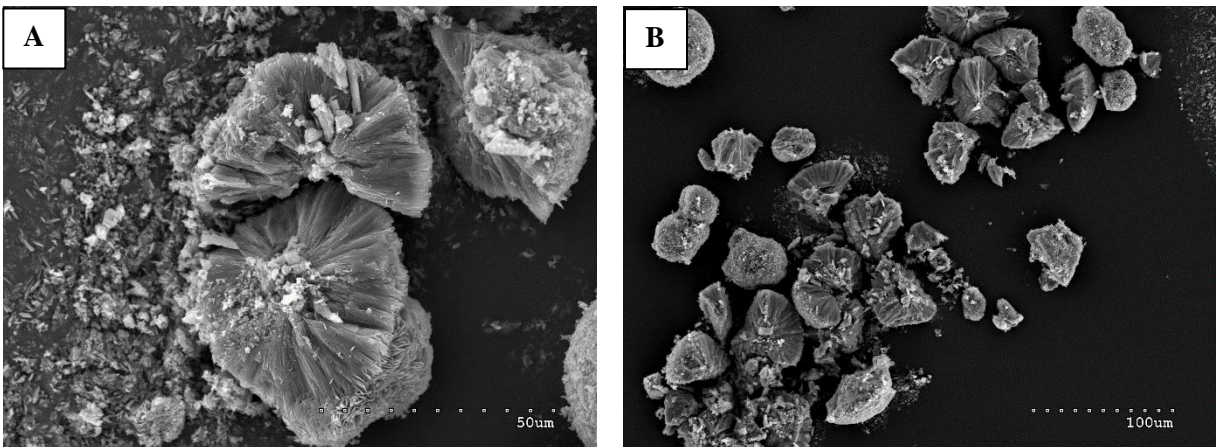
Ryc. 28. Mikrofotografie SEM dla CFK przed (A) i po napromieniowaniu (B) dawką 400 kGy.



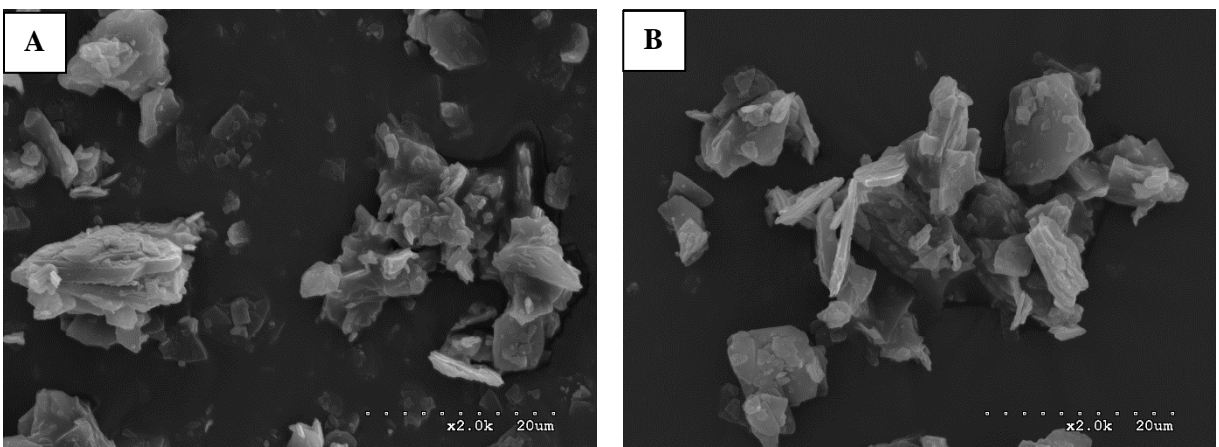
Ryc. 29. Mikrofotografie SEM dla CAA przed (A) i po napromieniowaniu (B) dawką 400 kGy.



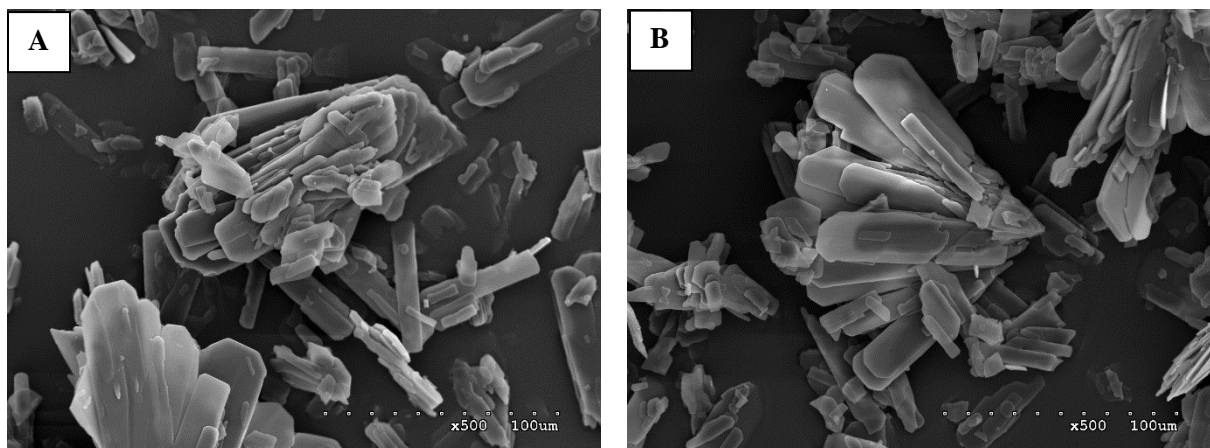
Ryc. 30. Mikrofotografie SEM dla CAK przed (A) i po napromieniowaniu (B) dawką 400 kGy.



Ryc. 31. Mikrofotografie SEM dla CSS przed (A) i po napromieniowaniu (B) dawką 400 kGy.



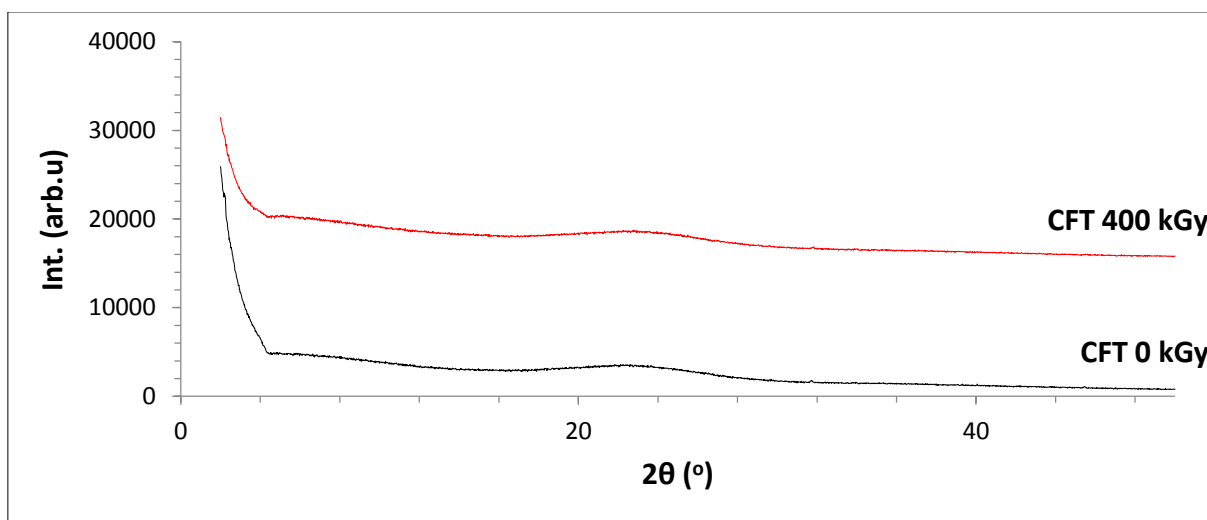
Ryc. 32. Mikrofotografie SEM dla CFP przed (A) i po napromieniowaniu (B) dawką 400 kGy.



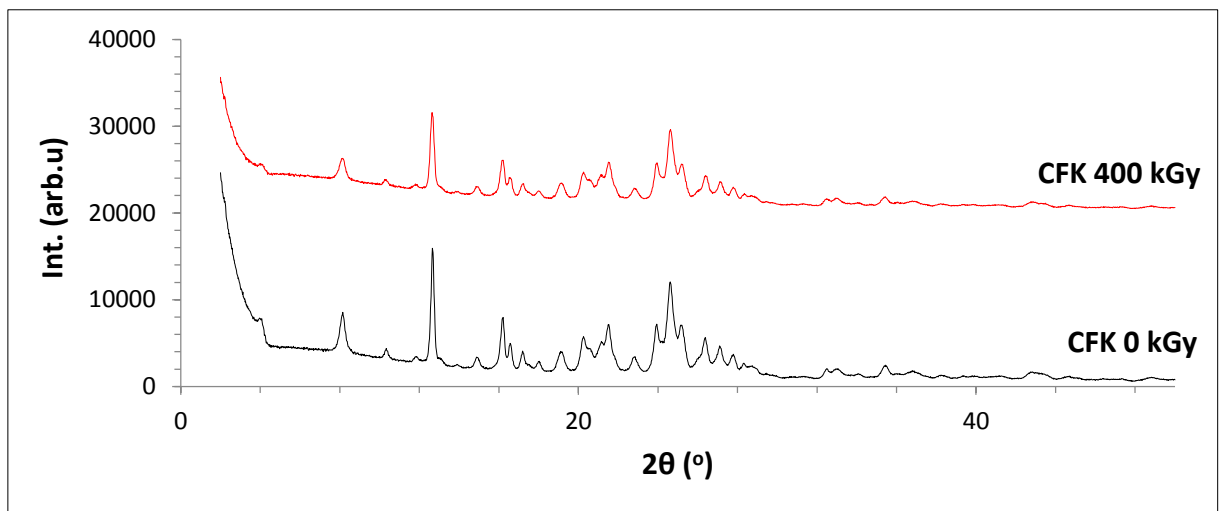
Ryc. 33. Mikrofotografie SEM dla CFE przed (A) i po napromieniowaniu (B) dawką 400 kGy.

5.8. Proszkowa dyfraktometria rentgenowska (XRPD)

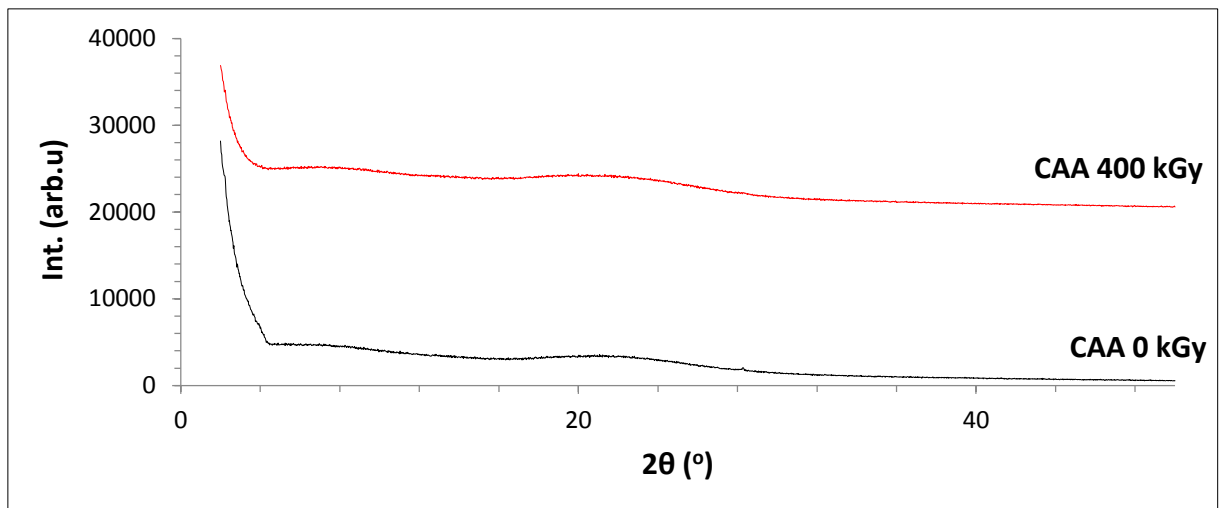
Dyfraktogramy proszkowe wybranych antybiotyków cefalosporynowych nienapromieniowanych i napromieniowanych dawką 400 kGy wykonano zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 4.5.6. Wyniki badań XRPD przedstawiono na rycinach 34-40.



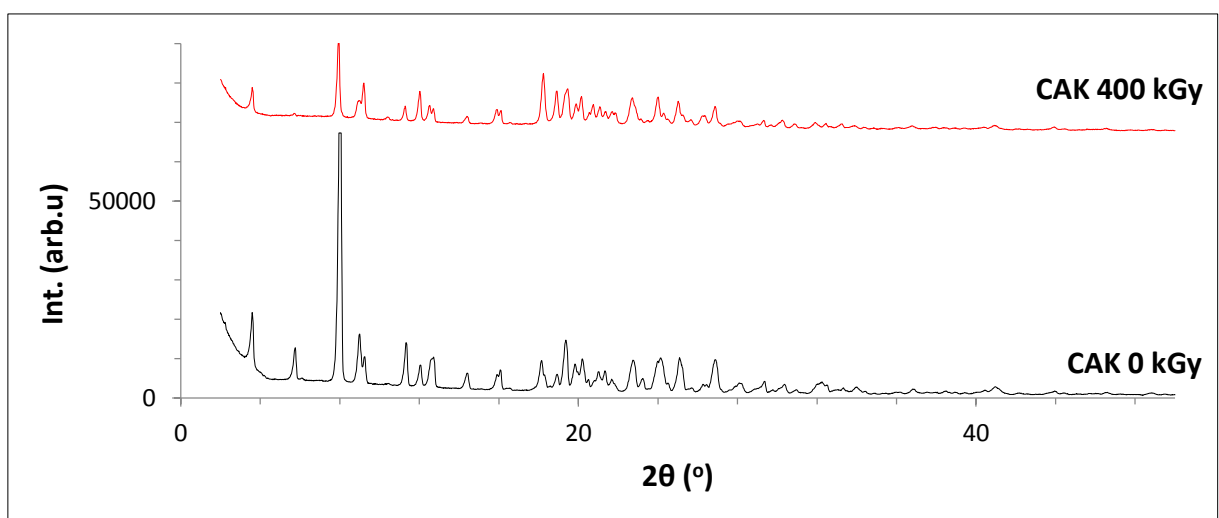
Ryc.34. Dyfraktogramy proszkowe ceftiofuru sodowego przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy



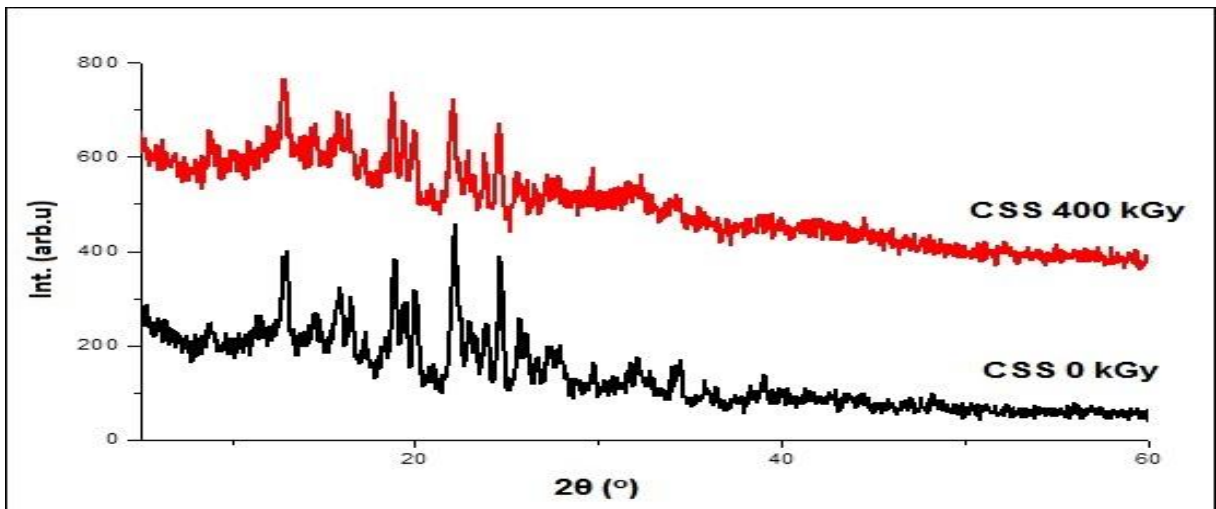
Ryc.35. Dyfraktogramy proszkowe siarczanu cefkwynomu przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy.



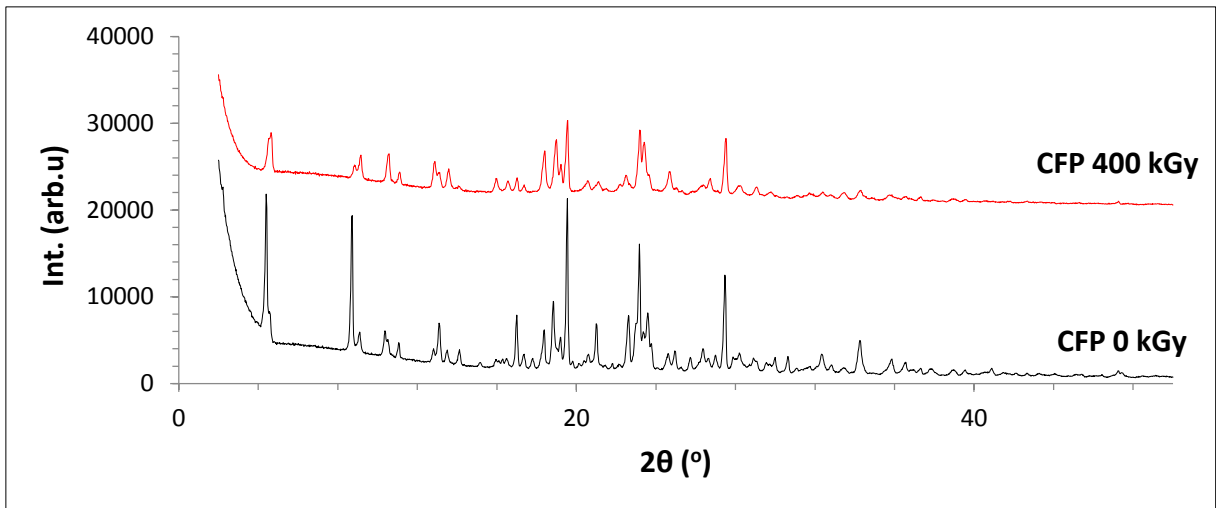
Ryc.36. Dyfraktogramy proszkowe cefuroksymu aksetylu (postać amorficzna) przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy.



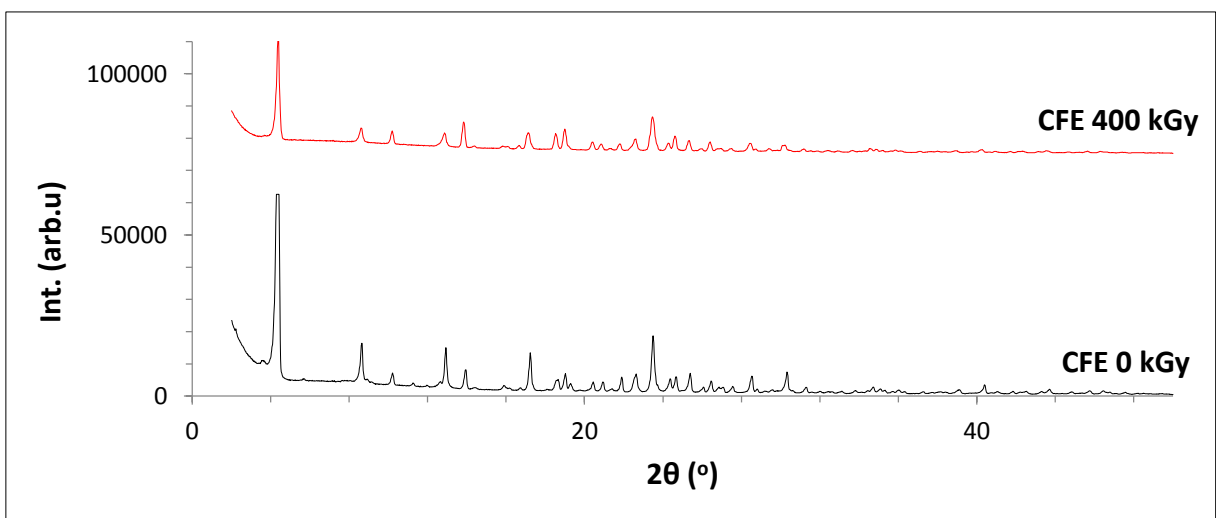
Ryc.37. Dyfraktogramy proszkowe cefuroksymu aksetylu (postać krystaliczna) przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy.



Ryc.38. Dyfraktogramy proszkowe siarczuanu cefoseliny przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy.



Ryc.39. Dyfraktogramy proszkowe dichlorowodoru cefepimu jednowodnego przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy.



Ryc.40. Dyfraktogramy proszkowe chlorowodoru cefetamet piwoksyli przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy.

5.9. Badania mikrobiologiczne

Badania mikrobiologiczne wybranych cefalosporyn zostały przeprowadzone według metodyki przedstawionej w rozdziale 4.5.7. Wyniki porównania aktywności mikrobiologicznej (wyrażone jako średnia wartość MIC z trzech powtórzeń) związków wyjaławianych przez sączenie z cefalosporynami napromieniowanymi dawką 25 kGy przedstawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Porównanie aktywności mikrobiologicznej cefalosporyn wyjaławianych przez sączenie (A) ze związkami napromieniowanymi dawką 25 kGy (B)

Związek	Metoda wyjaławiania	<i>Escherichia coli</i> MIC [µg/ml]	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MIC [µg/ml]	<i>Staphylococcus aureus</i> MIC [µg/ml]
CFT	A	0,25	0,125	0,5
	B	0,25	0,125	0,5
CFK	A	2,0	2,0	2,0
	B	2,0	2,0	2,0
CAA	A	2,0	2,0	2,0
	B	2,0	2,0	2,0
CAK	A	2,0	2,0	2,0
	B	2,0	2,0	2,0
CSS	A	0,125	32	2,0
	B	0,25	32	2,0
CFP	A	2,0	16,0	1,0
	B	2,0	16,0	1,0
CFE	A	1,0	0,5	4,0
	B	1,0	0,5	4,0

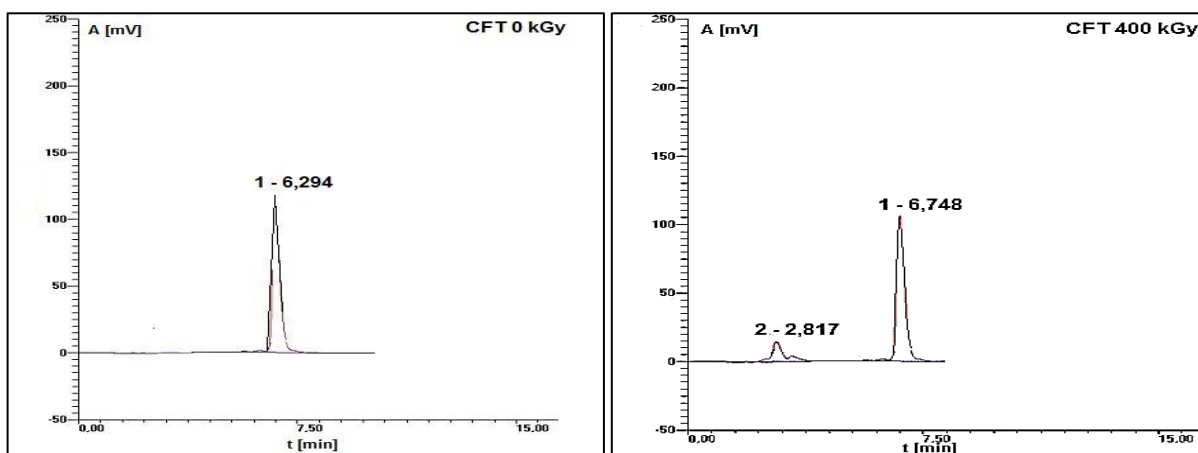
5.10. Analiza chromatograficzna (HPLC i UHPLC)

Walidację metod HPLC i UHPLC wykorzystanych do oceny zmian stężenia wybranych antybiotyków cefalosporynowych pod wpływem promieniowania jonizującego przeprowadzono zgodnie z metodyką przedstawioną w rozdziale 4.5.8.

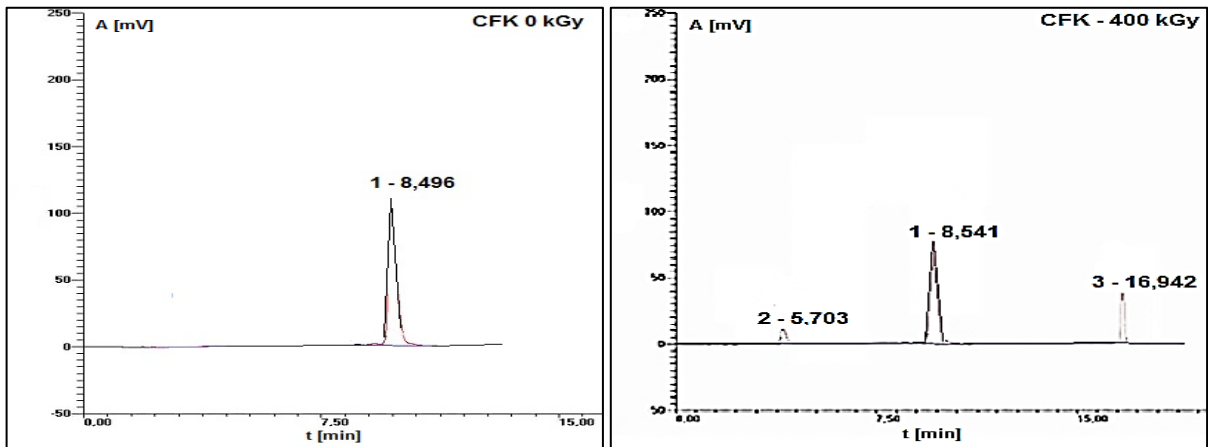
5.10.1. Wyniki walidacji/rewalidacji metod chromatograficznych

Rewalidacja metod HPLC do oceny zmian stężenia ceftiofuru sodowego, siarczanu cefkwinomu, cefuroksymu aksetylu (postać amorficzna i krystaliczna) i siarczanu cefoseliny pod wpływem promieniowania jonizującego

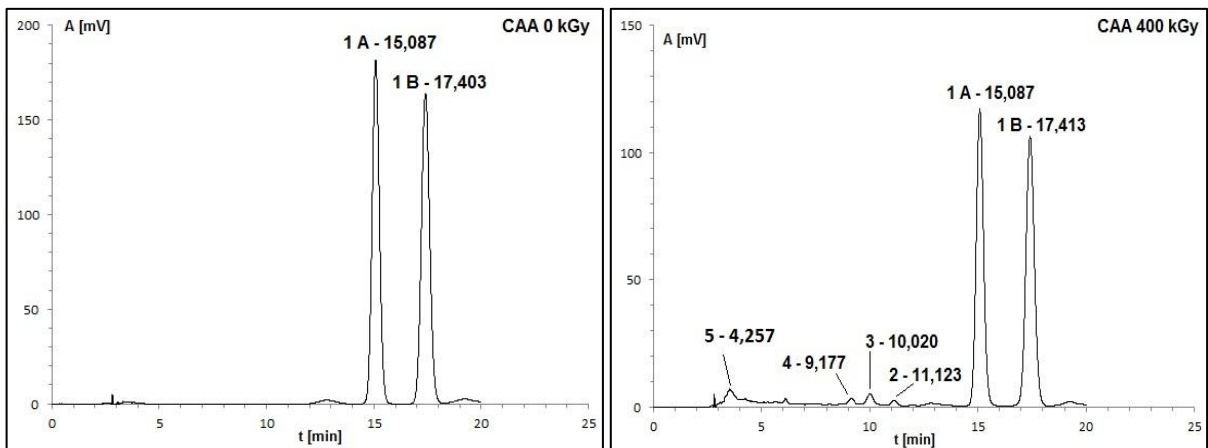
W przedziale czasu 0 – 20 min na chromatogramach obserwowano piki substancji badanych i produktów rozkładu, które nie interferowały z pikiem substancji badanych. Chromatogramy badanych cefalosporyn (nienapromieniowanych oraz poddanych działaniu promieniowania jonizującego w dawce 400 kGy) przedstawiono na rycinach 41-45.



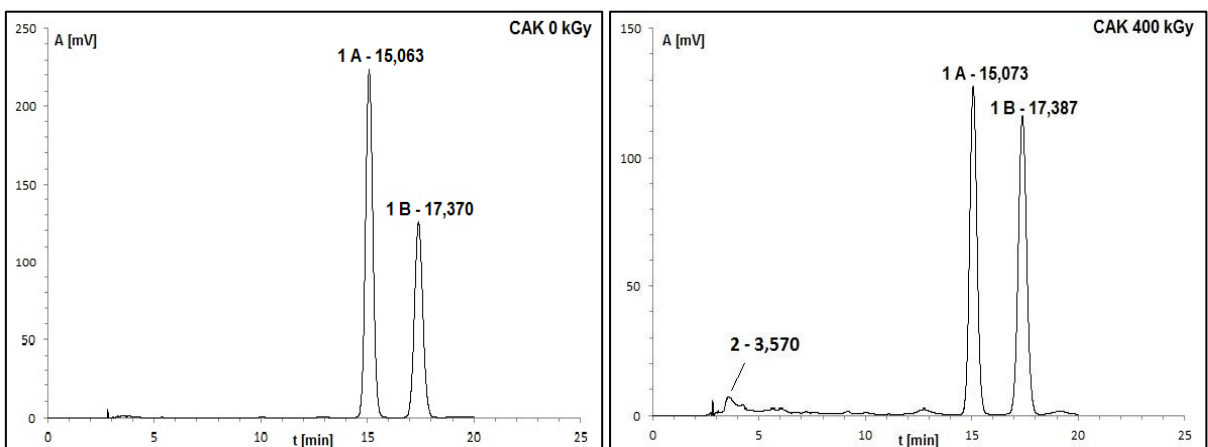
Ryc. 41. Chromatogramy ceftiofuru sodowego przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy (1-pik substancji badanej; 2-pik produktu rozkładu).



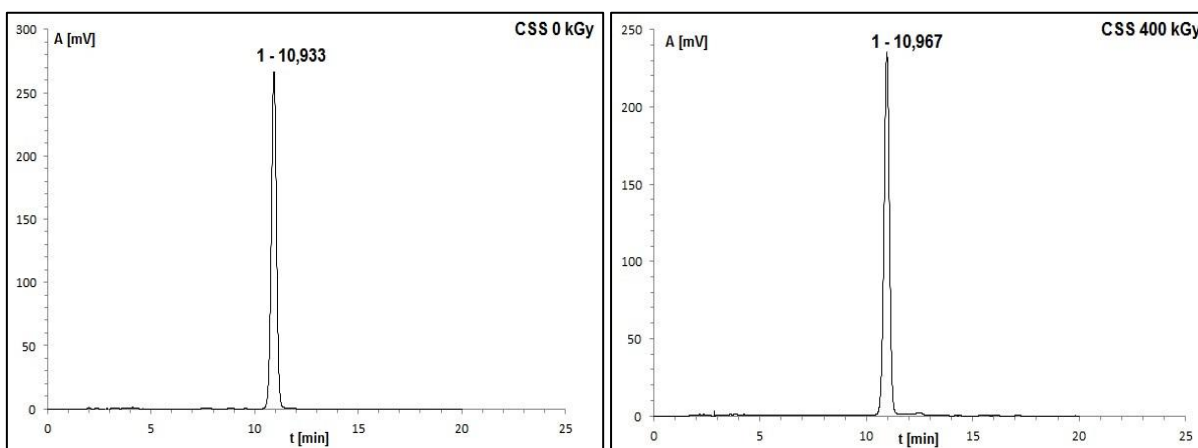
Ryc. 42. Chromatogramy siarcznanu cefkwinu przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy (1-pik substancji badanej; 2,3-piki produktów rozkładu).



Ryc. 43. Chromatogramy cefuroksymu aksetylu (postać amorficzna) przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy (1 A, 1 B-diastereoizomery cefuroksymu aksetylu; 2,3,4,5-piki produktów rozkładu).



Ryc. 44. Chromatogramy cefuroksymu aksetylu (postać krystaliczna) przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy (1 A, 1 B-diastereoizomery cefuroksymu aksetylu; 2-pik produktu rozkładu).

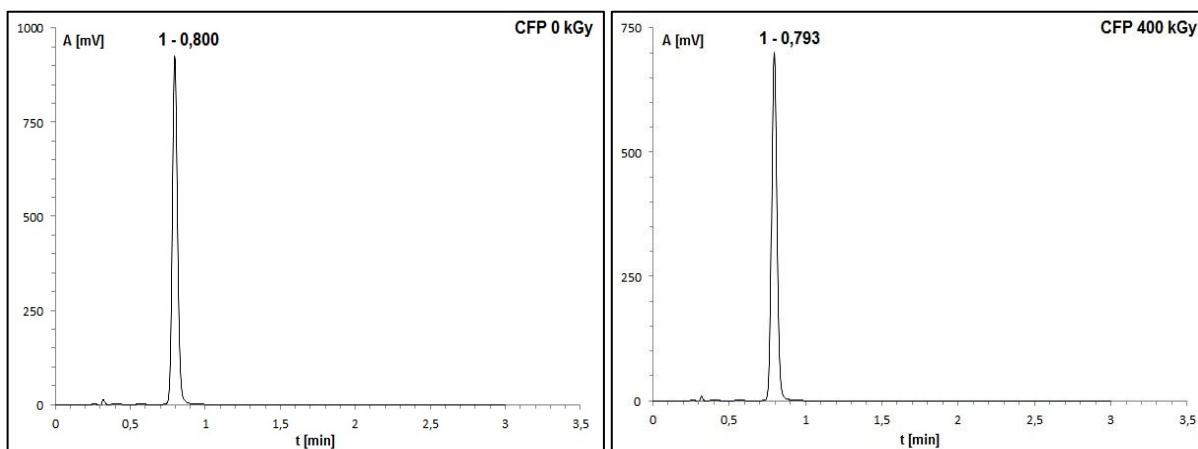


Ryc. 45. Chromatogramy ceftiofuru sodowego przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy (1-pik substancji badanej).

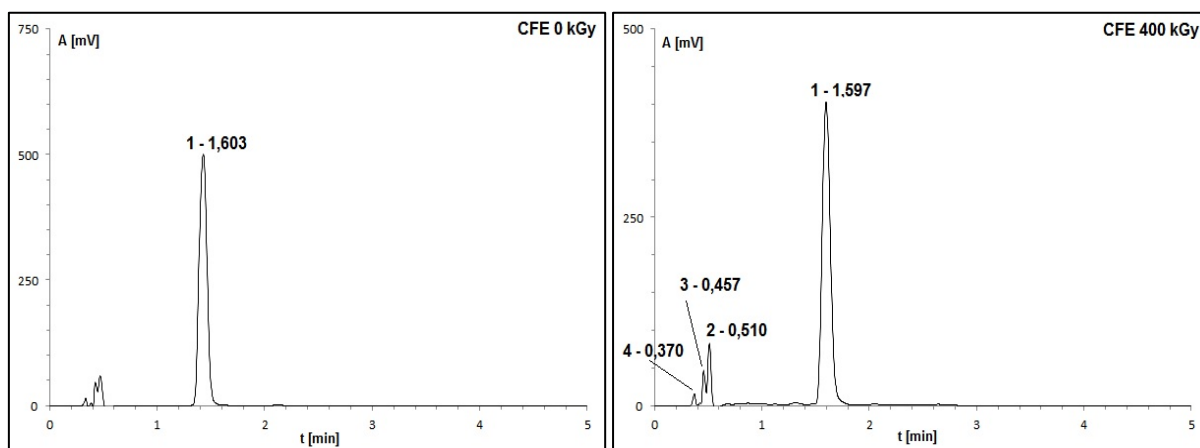
Walidacja metod chromatograficznych (HPLC dla dichlorowodorku cefepimu jednowodnego - CFP oraz UHPLC dla chlorowodorku cefetamet u piwoksyli - CFE) do oceny zmian ich stężenia pod wpływem promieniowania jonizującego.

Selektywność

W przedziale czasu 0 – 5 min na chromatogramach obserwowano piki substancji badanych i produktów rozkładu, które nie interferowały z pikiem substancji badanych. Chromatogramy badanych cefalosporyn (nienapromieniowanych oraz poddanych działaniu promieniowania jonizującego w dawce 400 kGy) przedstawiono na rycinach 46-47.



Ryc. 46. Chromatogramy dichlorowodorku cefepimu jednowodnego przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy (1-pik substancji badanej).



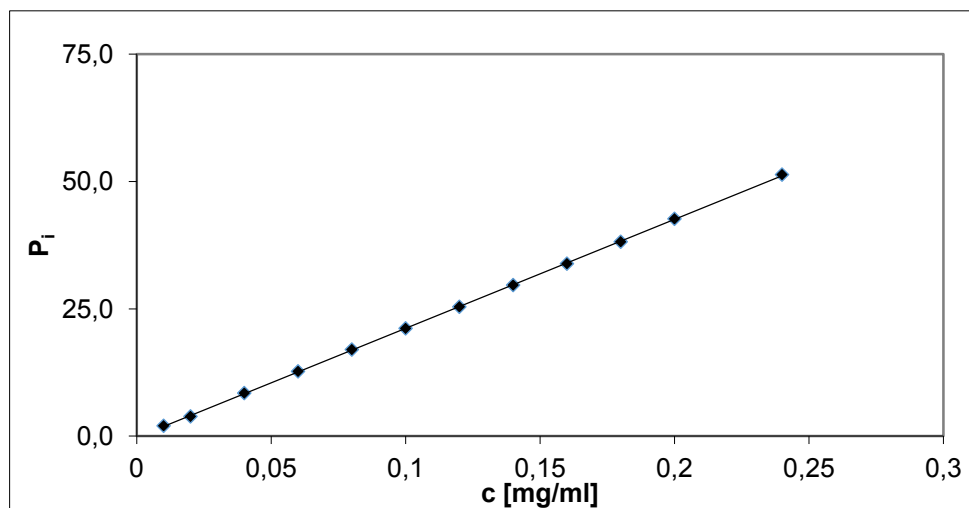
Ryc. 47. Chromatogramy chlorowodorku cefetamet u piwoksylu przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy (1-pik substancji badanej; 2,3,4-piki produktów rozkładu).

Liniowość

W tabelach 16 i 17 oraz na rycinach 48 i 49 przedstawiono wyniki badań liniowości metod chromatograficznych (HPLC dla dichlorowodorku cefepimu jednowodnego - CFP oraz UHPLC dla chlorowodorku cefetamet u piwoksylu - CFE) do oceny zmian stężenia wybranych cefalosporyn pod wpływem promieniowania jonizującego.

Tabela 16. Dane do krzywej wzorcowej dichlorowodoru cefepimu jednowodnego (CFP)

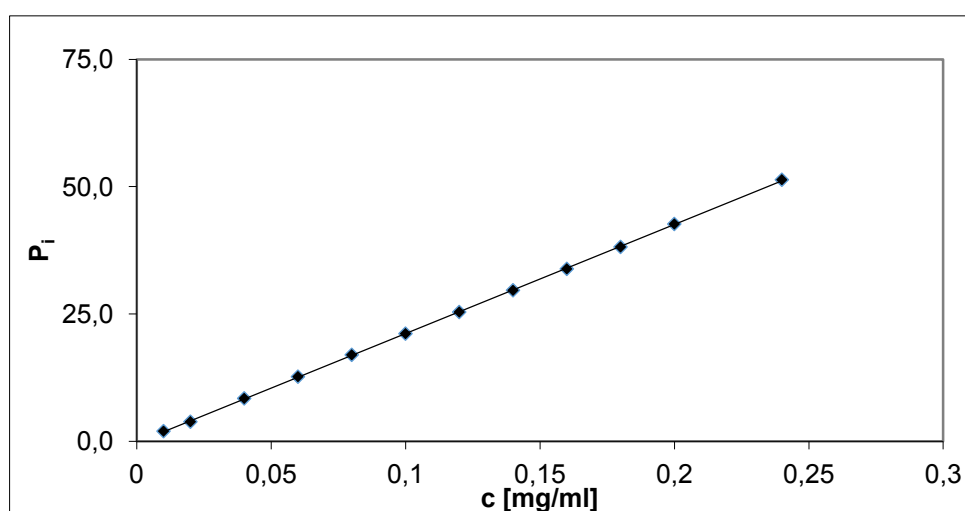
Lp.	c (mg/ml)	P _i	Ocena statystyczna prostej $y = ax + b$
1	0,24	58,5655	$a \pm \Delta a = 243,7193 \pm 3,7510$ $b \pm \Delta b = 0,7837 \pm 0,4982$ $S_a = 1,6836$ $S_b = 0,2236$ $r = 0,9998$
2	0,20	49,3877	
3	0,18	44,6358	
4	0,16	40,2476	
5	0,14	35,1386	
6	0,12	30,4573	
7	0,10	25,5021	
8	0,08	20,5610	
9	0,06	15,4350	
10	0,04	10,3061	
11	0,02	5,6486	
12	0,01	2,5405	
Ocena statystyczna istotności współczynnika b			
Zbadano istotność współczynnika b i stwierdzono, że wartość $t_b = b/S_b = 3,5048$ jest większa od wartości krytycznej $t_{0,05}(10) = 2,228$, co wskazuje, że wartość $b \neq 0$.			
Zatem współczynnik b jest istotny i zależność $P_i = f(c)$ opisuje równanie:			
$y = (243,7193 \pm 3,7510) x + (0,7837 \pm 0,4982)$			



Ryc. 48. Krzywa wzorcową dichlorowodoru cefepimu jednowodnego (CFP).

Tabela 17. Dane do krzywej wzorcowej chlorowodorku cefetamet u piwoksylu (CFE)

Lp.	c (mg/ml)	P _i	Ocena statystyczna prostej $y = ax + b$
1	0,24	51,3489	$a \pm \Delta a = 214,1886 \pm 1,2273$ $b \pm \Delta b = -0,2496 \pm 0,1630$ $S_a = 0,5508$ $S_b = 0,0732$ $r = 0,9999$
2	0,20	42,6610	
3	0,18	38,1595	
4	0,16	33,8541	
5	0,14	29,6487	
6	0,12	25,3809	
7	0,10	21,1444	
8	0,08	16,9803	
9	0,06	12,6945	
10	0,04	8,4316	
11	0,02	3,8508	
12	0,01	2,0039	
Ocena statystyczna istotności współczynnika b			
Zbadano istotność współczynnika b i stwierdzono, że wartość $t_b = b/S_b = -3,4122 $ jest większa od wartości krytycznej $t_{0,05}(10) = 2,228$, co wskazuje, że wartość $b \neq 0$.			
Zatem współczynnik b jest istotny i zależność $P_i = f(c)$ opisuje równanie:			
$y = (214,1886 \pm 1,2273) x + (-0,2496 \pm 0,1630)$			



Ryc.49. Krzywa wzorcow a chlorowodorku cefetamet u piwoksylu (CFE)

Wniosek:

Proponowane warunki rozdziału chromatograficznego zapewniają liniowość zależności wielkości analizowanych sygnałów (CFP i CFE) jako funkcji stężenia oznaczanych substancji w zakresie stężeń od 0,01 mg/ml do 0,24 mg/ml.

Precyzja

a) Precyzja bezpośrednia

Wyniki badania precyzji bezpośredniej opracowanych metod chromatograficznych przedstawiono w tabelach 18 i 19.

Tabela 18. Wyniki precyzji bezpośredniej oznaczania dichlorowodoru cefepimu jednowodnego (CFP)

c [mg/ml]	P _i	Ocena statystyczna
0,16	38,6906	wartość średnia: 38,5654 odchylenie standardowe (s): 0,2177 współczynnik zmienności (W _z): 0,5646% liczba prób: 6
	38,4682	
	38,2664	
	38,4098	
	38,7185	
	38,8390	
0,20	47,1434	wartość średnia: 47,3251 odchylenie standardowe (s): 0,1746 współczynnik zmienności (W _z): 0,3689% liczba prób: 6
	47,3705	
	47,0863	
	47,5212	
	47,4685	
	47,3609	
0,24	55,9989	wartość średnia: 56,2539 odchylenie standardowe (s): 0,1964 współczynnik zmienności (W _z): 0,3492% liczba prób: 6
	56,1927	
	56,2853	
	56,0989	
	56,4393	
	56,5084	

Tabela 19. Wyniki precyzji bezpośredniej oznaczania chlorowodoru cefetametum piwoksyli (CFE)

c [mg/ml]	P _i	Ocena statystyczna
0,16	33,8608	wartość średnia: 33,8541 odchylenie standardowe (s): 0,0446 współczynnik zmienności (W _z): 0,1316% liczba prób: 6
	33,9235	
	33,7995	
	33,8805	
	33,8414	
	33,8191	
0,20	42,7835	wartość średnia: 42,6610 odchylenie standardowe (s): 0,1842 współczynnik zmienności (W _z): 0,4317% liczba prób: 6
	42,7442	
	42,8242	
	42,6181	
	42,6799	
	42,3163	
0,24	51,3521	wartość średnia: 51,3489 odchylenie standardowe (s): 0,3062 współczynnik zmienności (W _z): 0,5963% liczba prób: 6
	51,3269	
	51,8980	
	51,3321	
	50,9607	
	51,2235	

b) Precyzja pośrednia

Wyniki badania precyzji pośredniej opracowanych metod chromatograficznych przedstawiono w tabelach 20 i 21.

Tabela 20. Wyniki precyzji pośredniej oznaczania dichlorowodoru cefepimu jednowodnego (CFP)

c [mg/ml]	P_i	Ocena statystyczna
0,16	40,3736	wartość średnia: 40,2476 odchylenie standardowe (s): 0,2983 współczynnik zmienności (W _z): 0,7413% liczba prób: 6
	40,3002	
	40,3334	
	40,4836	
	40,3423	
	39,6523	
0,20	49,8787	wartość średnia: 49,3877 odchylenie standardowe (s): 0,3845 współczynnik zmienności (W _z): 0,7785% liczba prób: 6
	49,1120	
	49,1024	
	49,8863	
	49,1613	
	49,1856	
0,24	58,4232	wartość średnia: 58,5655 odchylenie standardowe (s): 0,3110 współczynnik zmienności (W _z): 0,5319% liczba prób: 6
	58,5509	
	58,3902	
	58,4393	
	59,1892	
	58,4001	

Tabela 21. Wyniki precyzji pośredniej oznaczania chlorowodoru cefetamet u piwoksylu (CFE)

c [mg/ml]	P _i	Ocena statystyczna
0,16	33,6492	wartość średnia: 33,6558 odchylenie standardowe (s): 0,0297 współczynnik zmienności (W _z): 0,0882% liczba prób: 6
	33,6081	
	33,6976	
	33,6496	
	33,6731	
	33,6570	
0,20	42,1121	wartość średnia: 42,1498 odchylenie standardowe (s): 0,0615 współczynnik zmienności (W _z): 0,1460% liczba prób: 6
	42,1513	
	42,2192	
	42,1403	
	42,0595	
	42,2165	
0,24	50,6570	wartość średnia: 50,6328 odchylenie standardowe (s): 0,0678 współczynnik zmienności (W _z): 0,1339% liczba prób: 6
	50,5233	
	50,6361	
	50,5868	
	50,7020	
	50,6919	

Wniosek:

Opracowane metody chromatograficzne są precyzyjne, gdyż wartości współczynnika zmienności (W_z) dla wszystkich poziomów stężeń spełniają kryteria akceptacji (W_z ≤ 5%).

Dokładność

Wyniki badań dokładności opracowanych metod chromatograficznych, na podstawie oceny odzysku badanych cefalosporyn z placebo, przedstawiono w tabeli 22.

Tabela 22. Wyniki badań dokładności metod chromatograficznych do oceny zmian stężenia dichlorowodorku cefepimu jednowodnego (CFP) i chlorowodorku cefetamet u piwoksylu (CFE) (n = 6)

c [mg/ml]	odzysk CFP (RSD,%)	odzysk CFE (RSD,%)
0,16	95,82	102,08
0,20	95,82	99,42
0,24	96,05	97,79

Wniosek:

Opracowane metody chromatograficzne są dokładne, gdyż procentowe wartości odzysku badanych cefalosporyn z placebo (RSD) dla wszystkich poziomów stężeń spełniają kryteria akceptacji ($95\% \leq RSD \leq 105\%$).

Granice wykrywalności i oznaczalności

Granice wykrywalności (DL) i oznaczalności (QL) dichlorowodorku cefepimu jednowodnego (CFP) oraz chlorowodorku cefetamet u piwoksylu (CFE) dla opracowanych metod analitycznych przedstawiono w tabeli 23.

Tabela 23. Granice wykrywalności (DL) i oznaczalności (QL) CFP i CFE

związek	DL [μ g]	QL [μ g]
CFP	5,58	16,90
CFE	2,08	6,29

Podsumowanie parametrów walidacyjnych

Podsumowanie parametrów walidacyjnych metod chromatograficznych, HPLC dla dichlorowodorku cefepimu jednowodnego – CFP oraz UHPLC dla chlorowodorku cefetamet u piwoksylu – CFE, przedstawiono w tabeli 24.

Tabela 24. Podsumowanie parametrów walidacyjnych opracowanych metod chromatograficznych

Badany parametr			Kryterium akceptacji	Wynik	
				CFP	CFE
Selektywność - wpływ substancji interferujących			Rozdział pików substancji badanej od produktów rozkładu	Spełnia kryteria akceptacji	Spełnia kryteria akceptacji
Liniowość - współczynnik korelacji (r)			$\geq 0,9900$	0,9998	0,9999
Precyzja	bezpośrednia	80%	$W_z \leq 5\%$	$W_z = 0,5646\%$	$W_z = 0,1316\%$
		100%		$W_z = 0,3689\%$	$W_z = 0,4317\%$
		120%		$W_z = 0,3492\%$	$W_z = 0,5963\%$
	pośrednia	80%		$W_z = 0,7413\%$	$W_z = 0,0882\%$
		100%		$W_z = 0,7785\%$	$W_z = 0,1460\%$
		120%		$W_z = 0,5319\%$	$W_z = 0,1339\%$
Dokładność - odzysk z placebo			$95\% \leq RSD \leq 105\%$	RSD = 95,82%	RSD = 102,08%
				RSD = 95,82%	RSD = 99,42%
				RSD = 96,05%	RSD = 97,79%
Granica - detekcji (DL) - oznaczalności (QL)			-	DL = 5,58 μg QL = 16,90 μg	DL = 2,08 μg QL = 6,29 μg

5.10.2. Ocena zmian stężenia badanych cefalosporyn pod wpływem promieniowania jonizującego

Do oceny zmian stężenia badanych cefalosporyn (nienapromieniowanych oraz po ekspozycji na promieniowanie jonizujące) zastosowano metody HPLC lub UHPLC. Obliczono procentowe zmiany pól powierzchni pików substancji napromieniowanych przyjmując próbki nie poddane działaniu promieniowania jako odniesienie. Wyniki analizy ilościowej zostały zebrane w tabeli 25.

Tabela 25. Wyniki badań zawartości badanych cefalosporyn przed i po napromieniowaniu (A i B – diastereoizomery cefuroksymu aksetylu, C – zawartość sumy diastereoizomerów A i B). Wyniki przedstawiono jako procentową zawartość badanego związku w próbce

		0 kGy	25 kGy	50 kGy	100 kGy	200 kGy	400 kGy
CFT		100,0	101,7	93,2	97,1	78,7	76,6
CFK		100,0	89,3	89,7	83,4	85,6	75,8
CAA	A	100,0	96,9	89,1	87,8	78,8	64,4
	B	100,0	97,2	89,1	87,9	78,8	65,0
	C	100,0	97,0	89,1	87,8	78,8	64,7
CAK	A	100,0	85,7	83,2	71,7	75,4	55,3
	B	100,0	123,6	83,7	84,4	73,5	89,5
	C	100,0	104,6	83,4	78,0	74,4	72,4
CSS		100,0	97,0	99,7	86,8	82,8	82,8
CFP		100,0	90,2	96,8	94,9	89,3	84,8
CFE		100,0	95,3	95,3	91,5	89,8	83,9

5.10.3. Wyznaczanie parametrów kinetycznych rozkładu wybranych cefalosporyn po ekspozycji na promieniowanie jonizujące.

Parametry kinetyczne reakcji rozkładu badanych cefalosporyn pod wpływem promieniowania obliczono zgodnie z metodyką zawartą w rozdziale 4.5.8. Wyniki zamieszczono w tabeli 26.

Tabela 26. Parametry kinetyczne reakcji rozkładu badanych cefalosporyn pod wpływem wiązki elektronów o mocy 10 kGy/s

	$k \pm \Delta k [s^{-1}]$	$t_{0,5} [s]$	$t_{0,1} [s]$
CFT	$(7,48 \pm 4,81) \cdot 10^{-3}$	93	14
CFK	$(5,33 \pm 4,10) \cdot 10^{-3}$	130	20
CAA	$(10,5 \pm 2,1) \cdot 10^{-3}$	66	10
CAK	$(8,09 \pm 8,90) \cdot 10^{-3}$	87	13
CSS	$(4,04 \pm 5,75) \cdot 10^{-3}$	172	26
CFP	$(3,35 \pm 3,08) \cdot 10^{-3}$	207	32
CFE	$(3,87 \pm 1,57) \cdot 10^{-3}$	179	27

6. Omówienie wyników

Jednym z podstawowych kryteriów zapewnienia odpowiedniej jakości substancji leczniczej jest spełnienie kryterium czystości chemicznej, a w przypadku m.in. substancji podawanych pozajelitowo, także mikrobiologicznej. Parametr czystości mikrobiologicznej oznacza otrzymanie produktu pozbawionego drobnoustrojów i ich form przetrwalnikowych. Aby ten parametr osiągnąć należy zastosować taką metodę wyjaławiania, która nie spowoduje zmian we właściwościach fizykochemicznych substancji oraz zmniejszenia ich zawartości. O doborze metody sterylizacji decyduje przede wszystkim rodzaj substancji wyjaławianej, jej postać oraz obecność rozpuszczalników, w tym szczególnie wody. Nie bez znaczenia jest także koszt procesu i czas konieczny do otrzymania sterylnego produktu. Najskuteczniejszym sposobem uzyskania jałowych substancji i/lub produktów leczniczych jest sterylizacja termiczna. Metoda ta nie może być zastosowana w przypadku leków podatnych na rozkład w warunkach podwyższonej temperatury i wilgotności względnej powietrza. Alternatywnym sposobem wyjaławiania jest wykorzystanie promieniowania jonizującego w dawce 25 kGy. Wykorzystanie promieniowania jonizującego jest możliwe z uwagi na jego właściwości bakteriobójcze, które polega na uszkodzaniu materiału genetycznego oraz białek funkcjonalnych i strukturalnych mikroorganizmów, co powoduje zahamowanie ich czynności życiowych. Mechanizm oddziaływania promieniowania jonizującego z drobnoustrojami może mieć charakter:

- bezpośredni, polegający na wybiciu elektronu z makrocząsteczek komórkowych i generowaniu reaktywnych wolnych rodników lub,
- pośredni, który polega na powstawaniu wysoce reaktywnych produktów radiolizy wody, które zapoczątkowują reakcje następcze, które prowadzą do efektu letalnego.

Metoda radiacyjna, służąca do sterylizacji leków, została użyta po raz pierwszy w latach 80. ubiegłego stulecia w Stanach Zjednoczonych. Jako oficjalna metoda sterylizacji została opisana w XX Farmakopei Amerykańskiej oraz w drugim wydaniu Farmakopei Europejskiej. Do celów sterylizacji używa się zwykle wiązki elektronów o energii do 5 MeV, co umożliwia odpowiednią przenikliwość i wpływa na zwiększenie efektywności napromieniowania.

Sterylizacja radiacyjna jest uważana obecnie za najlepszą metodę wyjaławiania, jednak podstawowym jej ograniczeniem jest możliwość uszkodzenia wyjaławianego materiału, co

wynika przede wszystkim z powstawania wolnych rodników, które mogą zapoczątkować reakcje łańcuchowe i w konsekwencji prowadzić do trwałych produktów rozkładu. W związku z powyższym, obecnie preferowana jest sterylizacja substancji leczniczych w stanie stałym, w którym są one w znacznie mniejszym stopniu narażone na uszkodzenia. Do najczęściej obserwowanych zmian w lekach poddanych napromieniowaniu zalicza się powstawanie defektów w sieci krystalicznej, zmianę postaci polimorficznej, zmianę zawartości wody, zabarwienia i innych właściwości fizykochemicznych oraz powstawanie wolnych rodników i produktów radiolizy. Dotychczasowe badania wykazały, że nawet w obrębie tej samej grupy chemicznej leków, występują znaczne różnice w podatności na zmiany pod wpływem promieniowania, stąd badania takie powinny być prowadzone dla każdej substancji leczniczej indywidualnie. Aby mieć pewność, że w wyniku poddania danej substancji procesowi sterylizacji otrzymamy jałową substancję o takich samych właściwościach fizykochemicznych, konieczne jest przeprowadzenie kompleksowych badań potwierdzających jej radiochemiczną trwałość.

Dotychczasowe badania wpływu promieniowania jonizującego na trwałość i aktywność przeciwbakteryjną cefalosporyn dotyczyły między innymi:

- wpływu promieniowania gamma (^{137}Cs , ^{60}Co) na trwałość ceftazydymu [98], cefotaksymu [99,100], cefuroksymu sodowego [100,101], cefaleksyny [102], cefalorydyny [102], cefalotyny [102], cefapiryny [102], cefazoliny sodowej [103], cefadroksylu [103] i ceforanidu [103],
- wpływu promieniowania gamma i wiązki elektronów na trwałość cefdiniru i cefiksymu [19],
- wpływu promieniowania jonizującego w postaci wiązki elektronów na trwałość cefazoliny w preparacie Kefzol [104].

W prowadzonych powyżej badaniach określono ilość wolnych rodników oraz czas ich życia. W przypadku ceftazydymu zidentyfikowano tworzące się wolne rodniki a także oceniono jego czystość mikrobiologiczną i zawartość w próbkach poddanych działaniu promieniowania. Stwierdzono, że promieniowanie gamma wywiera większy destrukcyjny wpływ na analizowane cefalosporyny, co znalazło odzwierciedlenie w różnicach w zawartości badanych związków.

W przypadku cefdiniru i cefiksymu stwierdzono dwukrotnie większy ubytek substratu pod wpływem promieniowania gamma niż pod wpływem wiązki elektronów. Stwierdzono także obniżenie aktywności przeciwbakteryjnej, które nie zawsze korelowało ze wzrostem dawki promieniowania. Obniżenie aktywności przeciwbakteryjnej stwierdzono dla cefaleksyny, cefalotyny, cefapiryny i cefalorydyny (powyżej 10 kGy).

Wykazano, że związkami, które mogą być sterylizowane z wykorzystaniem promieniowania gamma, jest cefotaksym, cefuroksym sodowy oraz cefazolina sodowa. Również produkt leczniczy Kefzol, zawierający cefazolinę, może być wyjaławiany za pomocą wiązki wysokoenergetycznych elektronów, jednakże ograniczeniem tej metody może być zmiana zabarwienia produktu leczniczego po sterylizacji.

Pomimo podobieństw w budowie cefalosporyn, dla każdej substancji leczniczych konieczne jest przeprowadzenie indywidualnych badań potwierdzających lub wykluczających możliwość zastosowania sterylizacji radiacyjnej jako metody wyjaławiania, dlatego celem niniejszej pracy jest określenie wpływu promieniowania jonizującego na trwałość ceftiofuru sodowego, siarczanu cefkwinomu, cefuroksymu aksetylu, siarczanu cefoseliny, dichlorowodoru cefepimu jednowodnego i chlorowodoru cefetametu piwoksylu. Wzory wybranych do badań cefalosporyn przedstawiono w tabeli 27.

Tabela 27. Cefalosporyny wybrane do badań

Nazwa związku	Skrót	Wzór
Ceftiofur sodowy	CFT	
Siarczan cefkwinomu	CFK	

Cefuroksym aksetylu (amorficzny)	CAA	
Cefuroksym aksetylu (krystaliczny)	CAK	
Siarczan cefoseliny	CSS	
Dichlorowodorek cefepimu jednowodny	CFP	
Chlorowodorek cefetametuwoksylu	CFE	

Wszystkie badane cefalosporyny, z wyjątkiem cefuroksymu aksetylu, zawierają ugrupowanie iminoalkoksylowe i aminotiazolowe w podstawniku acylowym w pozycji C7. Związki te charakteryzują się wysoką opornością na działanie β -laktamaz, uwarunkowaną obecnością ugrupowania iminoalkoksy w pozycji *syn*, gdyż odpowiednie *anti*-izomery są nieaktywne wobec *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*. Przeprowadzone badania *syn*- i *anti*-izomerów wykazały, że zmiany aktywności są spowodowane małym powinowactwem *anti*-izomerów do PBP-bakterii, a nie utratą oporności na działanie β -laktamaz, lub obniżeniem możliwości penetracji antybiotyku przez zewnętrzne warstwy błony komórkowej bakterii. Pochodne te wykazują szeroki zakres działania, obejmujący szczególnie bakterie Gram-ujemne, ale również Gram-dodatnie. Cefuroksym aksetylu zawiera zamiast podstawnika

aminotiazolowego podstawnik furylowy, który przyczynia się do wzrostu aktywności oraz oporności na działanie β -laktamaz.

Wybrane do badań cefalosporyny zaliczane są do:

- II generacji (cefuroksym aksetylu),
- III generacji (ceftiofur sodowy, chlorowodorek cefetametu piwoksylu),
- IV generacji (siarczan cefkwinomu, siarczan cefoseliny, dichlorowodorek cefepimu jednowodny).

W badaniach użyto związki *in substantia*, tylko w przypadku dichlorowodoru cefepimu, zastosowano preparat Maxipime, w skład którego wchodzi także L-arginina. Dwie badane cefalosporyny (ceftiofur sodowy i cefuroksym aksetylu) występowały jako amorficzne, pozostałe były krystalicznymi proszkami.

Zaplanowane w niniejszej pracy badania wpływu promieniowania jonizującego na trwałość wybranych cefalosporyn, miały na celu dostarczenie jednoznacznych dowodów, że promieniowanie jonizujące, z jednej strony zapewni uzyskanie produktu jałowego, a z drugiej strony, nie wpłynie negatywnie na trwałość badanych substancji.

Badane substancje poddano działaniu promieniowania w linowym akceleratorze elektronów, w dawce standardowej 25 kGy oraz w dawkach 50, 100, 200 i 400 kGy, a następnie określono zmiany we właściwościach fizykochemicznych substancji, zbadano ich aktywność mikrobiologiczną oraz oceniono parametr zawartość. W pierwszym etapie badań oceniono właściwości napromieniowanych związków z wykorzystaniem metod bezpośrednich, nie wymagających wstępnego przygotowania próbki.

Analiza wagowa

Zaobserwowane różnice masy substancji nienapromieniowanych i poddanych napromieniowaniu są mniejsze niż błąd pomiaru, co potwierdza, że w czasie ekspozycji na promieniowanie jonizujące nie powstają lotne produkty rozkładu.

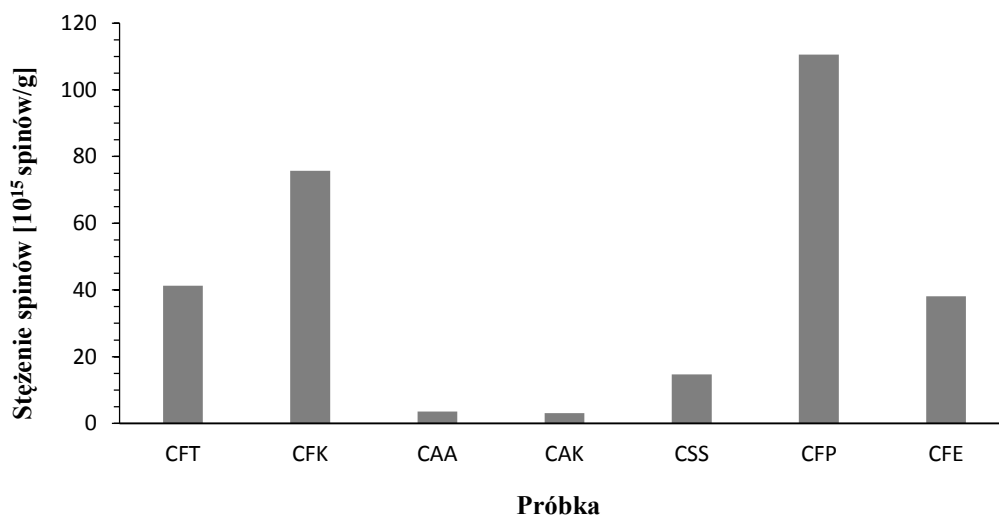
Analiza organoleptyczna

Zmiana zabarwienia napromieniowanych substancji jest spowodowana powstawaniem barwnych produktów rozkładu, które absorbują promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie widzialnym i które tworzą także barwne roztwory w wyniku uszkodzenia sieci krystalicznej i powstania tzw. centrów barwnych, zwanymi także centrami F lub elektronowymi oraz ich kombinacji, które absorbują światło widzialne, powodując tym samym powstawanie zabarwienia lub zmianę zabarwienia.

Wszystkie badane substancje były białymi, krystalicznymi lub bezpostaciowymi proszkami, bez zapachu. Po rozpuszczeniu w wodzie lub metanolu, tworzyły bezbarwne, przezroczyste roztwory. Wyjątkiem był siarczan cefkwinomu, którego zabarwienie było jasnożółte i który posiadał charakterystyczny zapach. Zabarwienie badanych cefalosporyn zmieniało się wraz z wielkością pochłoniętej dawki promieniowania z białego lub bardzo jasnożółtego do żółtego lub intensywnie żółtego. Najmniej podatny na zmiany zabarwienia był chlorowodorek cefetametum piwoksylu, którego wyjściowe zabarwienie nie uległo zmianie do dawki 100 kGy. Zmiany zabarwienia cefalosporyn w fazie stałej po ekspozycji na promieniowanie mogą wynikać z defektów w sieci krystalicznej i spulapkowanych w niej wolnych rodników. Postać i zapach napromieniowanych substancji leczniczych nie różniły się od próbek nie poddanych działaniu promieniowania. Zaobserwowano również, że badane cefalosporyny poddane działaniu promieniowania, po rozpuszczeniu w wodzie lub w metanolu, tworzyły przezroczyste i bezbarwne roztwory, co potwierdza, że ekspozycja na promieniowanie nie powoduje powstawania barwnych produktów radiodegradacji, w tym także barwnych wolnych rodników.

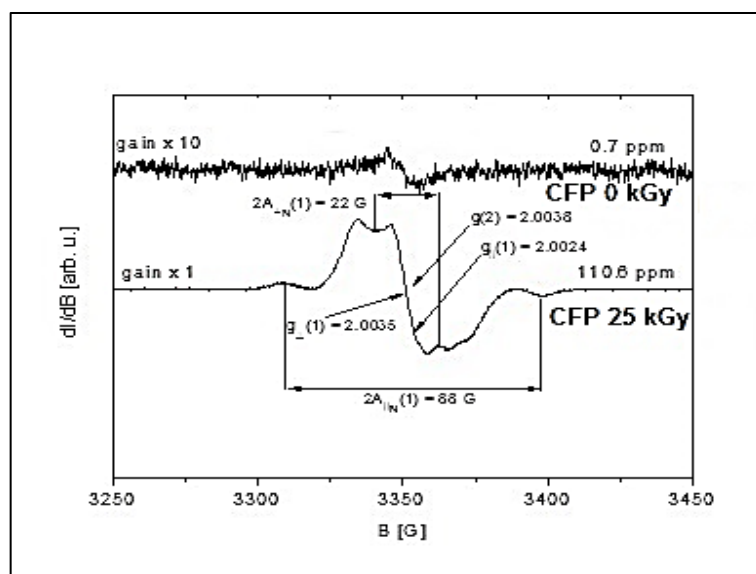
Spektrometria elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR)

Obecność wolnych rodników stwierdzono we wszystkich próbkach cefalosporyn napromieniowanych dawką 25 kGy. Ilość wolnych rodników w badanych związkach wahała się w zakresie od $3,06 \cdot 10^{15}$ spin/g (postać krystaliczna cefuroksymu aksetylu) do $110,6 \cdot 10^{15}$ spin/g (dichlorowodorek cefepimu jednowodny) (Rycina 50).

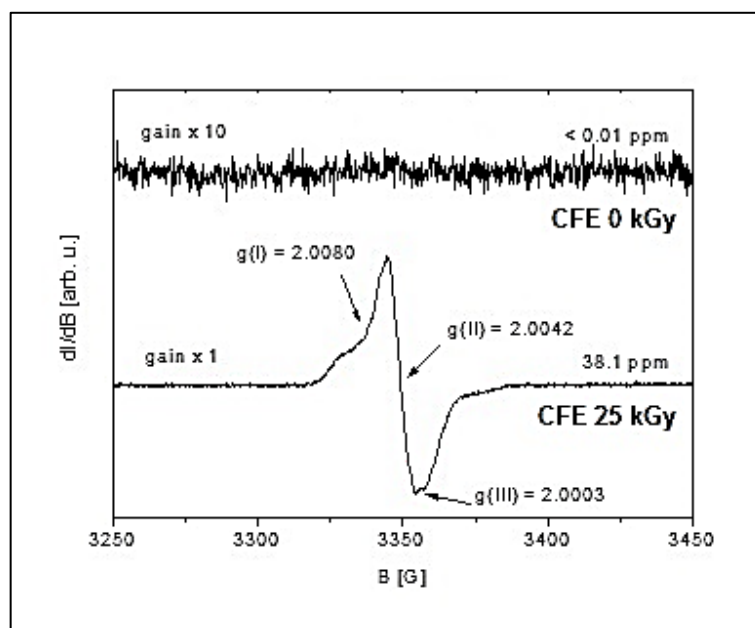


Ryc. 50. Porównanie początkowej ilości wolnych rodników w próbkach napromieniowanych cefalosporyn.

Przykładowe widma EPR preparatu Maxipime z dichlorowodorkiem cefepimu oraz chlorowodorku cefetamet u piwoksylu przedstawiono na rycinach 51 i 52.

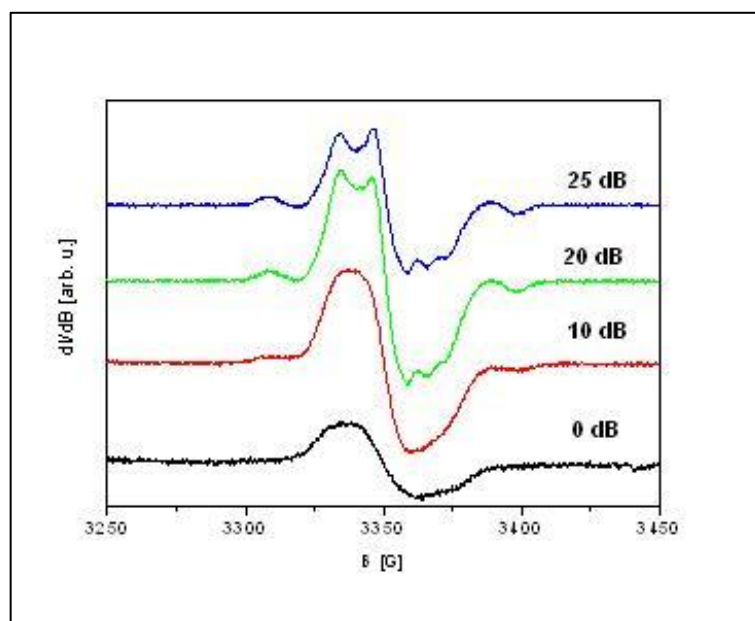


Ryc. 51. Widmo EPR produktu Maxipime zawierającego dichlorowodorek cefepimu i L-argininę.



Ryc. 52. Widmo EPR chlorowodorku cefetamet u piwoksylu.

W próbce napromieniowanego produktu leczniczego Maxipime można wyróżnić przynajmniej dwa różnego rodzaju rodniki, które zostały oznaczone jako (1) i (2). W pierwszym przypadku niesparowany elektron oddziałuje z jądrem azotu. Oddziaływanie to jest opisane anizotropową stałą oddziaływania nadsubtelnego w orientacji równoległej (indeks \parallel) $A_{\parallel N}(2) = 44 \text{ G}$ i prostopadłej (indeks \perp) $A_{\perp N}(1) = 11 \text{ G}$. Współczynnik rozszczepienia spektroskopowego dla podanego rodnika azotowego wynosi w orientacji równoległej $g_{\parallel}(1) = 2,0024$ oraz w prostopadłej $g_{\perp}(1) = 2,0035$. Anizotropia parametrów EPR (A i g) jest często obserwowana w przypadku rodników azotowych. Rodnik typu (1) powstaje najprawdopodobniej w wyniku oderwania wodoru przy grupie NH_2 lub NH . Można przypuszczać, że takie oderwanie atomu wodoru zachodzi prawdopodobnie w L-argininie, a nie cefepimie, gdyż podobnego rodnika nie zarejestrowano dla innych cefalosporyn. Dla drugiego rodnika $g(2) = 2,0038$. O tym, że mamy do czynienia z dwoma różnego rodzaju rodnikami świadczy zmiana kształtu widma i nasycanie linii pochodzących od rodników azotowych w funkcji mocy mikrofal (Rycina 53).



Ryc. 53. Zmiana kształtu widma napromieniowanego produktu leczniczego Maxipime w funkcji mocy mikrofal.

W przypadku chlorowodoru cefetamet u piwoksylu, w próbce napromieniowanej występują prawdopodobnie trzy różnego rodzaju rodniki o współczynnikach rozszczepienia spektroskopowego $g(\text{I}) = 2,0080$, $g(\text{II}) = 2,0042$ i słabo intensywny rodnik III o wartości $g(\text{III}) = 2,0003$.

Zanik wolnych rodników w napromieniowanych substancjach jest eksponencjalny (ryciny 54-56) i może być opisany równaniem:

$$I(t) = I_0 + I_1 \exp(-t/T_1)$$

gdzie:

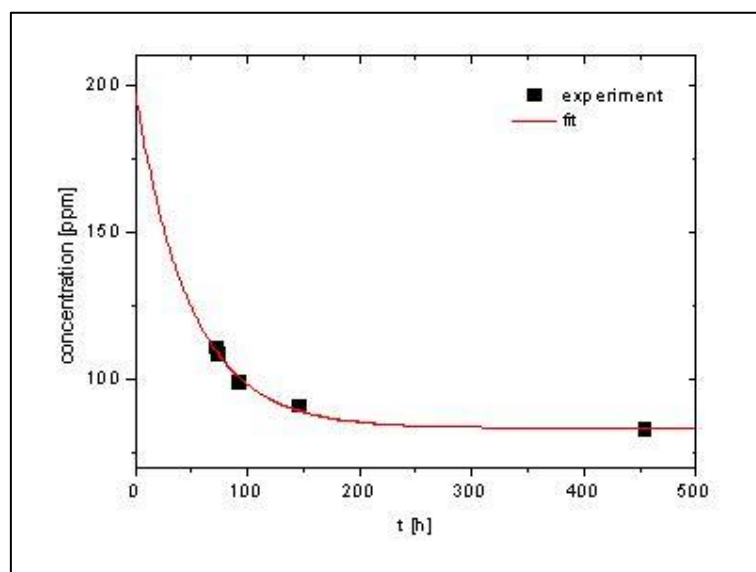
$I(t)$ – stężenie wolnych rodników po czasie t ,

I_0 – stężenie trwałych wolnych rodników,

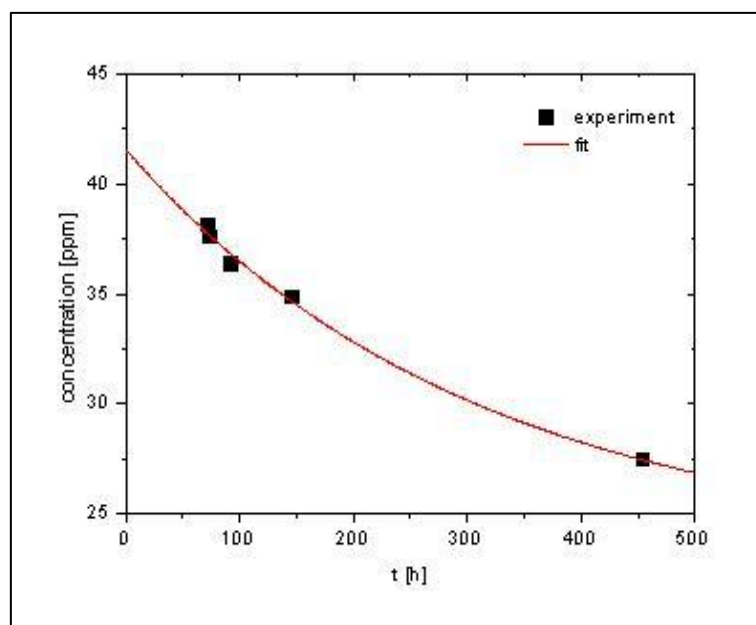
I_1 – stężenie wolnych rodników ulegających zanikowi po średnim czasie życia t_1 ,

t – czas,

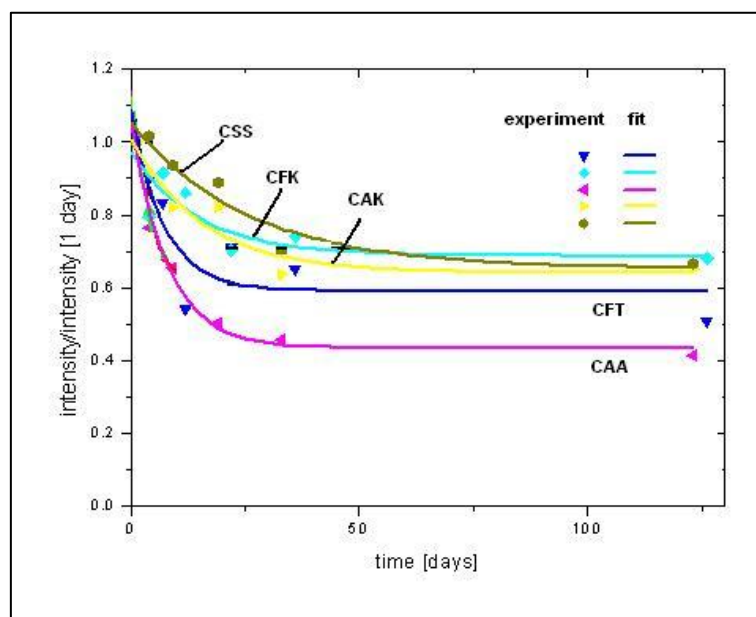
T_1 – czas zaniku niestabilnych wolnych rodników.



Ryc. 54. Zanik wolnych rodników w napromieniowanym produkcie leczniczym Maxipime.



Ryc. 55. Zanik wolnych rodników w napromieniowanym chlorowodoru cefetamet u piwoksylu.

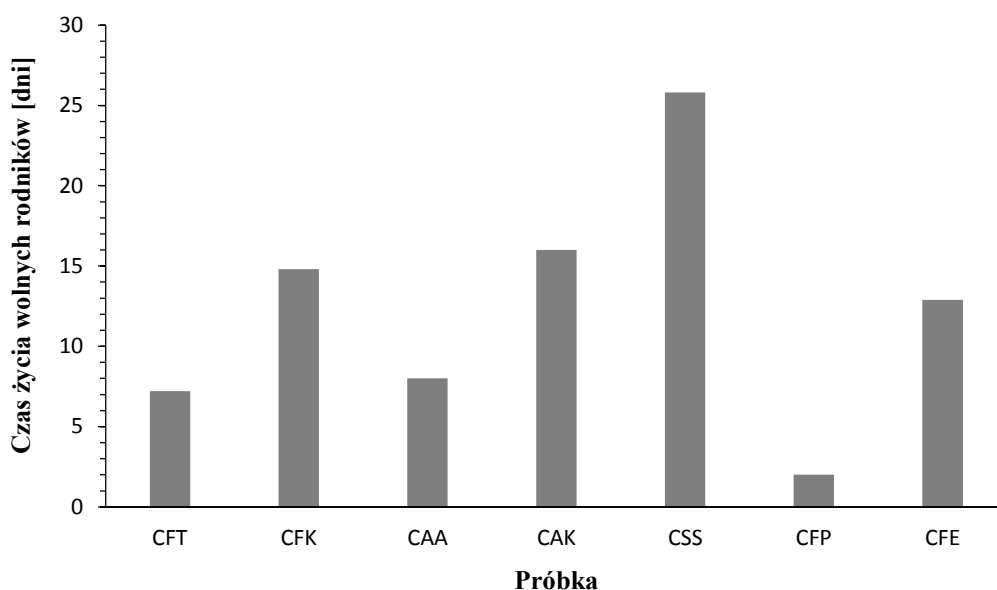


Ryc. 56. Zanik wolnych rodników w napromieniowanych próbkach ceftiofuru sodowego (CFT), siarczanu cefkwinomu (CFK), cefuroksymu aksetylu amorficznego (CAA), cefuroksymu aksetylu krystalicznego (CAK) i siarczanu cefoseliny (CSS).

W przypadku produktu leczniczego Maxipime w czasie $t = 0$ h, stężenie wolnych rodników wynosi 196,3 ppm (83,6 ppm + 113 ppm). Rodniki o stężeniu $I_0 = 83,6$ ppm są stabilne ($T = \infty$), a czas zaniku niestabilnych rodników wynosi 49 h. Bardzo wysoka zawartość wolnych rodników w próbkach produktu Maxipime może być związana nie tylko z obecnością L-argininy ale także wody, gdyż dichlorowodorek cefepimu występuje w postaci jednowodnej. Jest wiadomym, że produkty radiolizy wody mogą oddziaływać z substancją leczniczą i powodować jej rozkład. W przypadku rozpatrywania możliwości wykorzystania sterylizacji radiacyjnej jako metody wyjaławiania tego produktu, niezbędne byłoby zastosowanie substancji radioprotekcyjnej, która na zasadzie zmiatacza wolnych rodników, chroniłaby cząsteczkę substancji aktywnej, jak również substancji pomocniczej, przed wysoce reaktywnymi produktami radiolizy wody.

W przypadku chlorowodoru cefetamet u piwoksylu, zanik wolnych rodników następował w czasie $T_1 = 309$ h. W czasie $t = 0$ początkowe stężenie wolnych rodników wynosiło 41,5 ppm, przy czym 23,2 ppm to stabilne wolne rodniki w napromieniowanej substancji.

Na rycinie 57 przedstawiono porównanie czasu życia wolnych rodników w próbkach napromieniowanych cefalosporyn.



Ryc. 57. Porównanie czasu życia wolnych rodników w próbkach napromieniowanych cefalosporyn.

Najkrótszy czas życia wolnych rodników stwierdzono w przypadku produktu leczniczego Maxipime – 2 dni, najdłuższy zaś w przypadku siarczanu cefoseliny – 25,8 dnia. Bardzo duża ilość wolnych rodników w napromieniowanej próbce produktu leczniczego Maxipime a także ich krótki czas życia mogą być związane z obecnością wody i L-argininy w tym preparacie.

Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR) i Ramana

W przypadku napromieniowanych próbek ceftiofuru sodowego, cefuroksymu aksetylu w postaci amorficznej i krystalicznej i chlorowodoru cefetamet u piwoksyłu nie zaobserwowano istotnych różnic w położeniu i kształcie poszczególnych pasm, w odniesieniu do widm zarejestrowanych dla związków nienapromieniowanych. W przypadku chlorowodoru cefetamet u piwoksyłu jedyną dostrzegalną zmianą jest zmniejszenie intensywności pasm związanych z drganiami rozciągającymi wiązań C-N w pierścieniu tiazolu i cefemu (przy 1387 i 1442 cm^{-1}). Jednakże jest ona na tyle mała, że nie pozwala na potwierdzenie rozkładu chlorowodoru cefetamet u piwoksyłu pod wpływem promieniowania, co znajduje odzwierciedlenie w zawartości tych związków po ekspozycji na promieniowanie w dawce 25 kGy.

Analizując widma napromieniowanego (25 i 400 kGy) siarczanu cefkwinomu i porównując je z widmami próbki referencyjnej zauważono pojawienie się dodatkowego pasma przy

620 cm^{-1} , które może pochodzić od drgań zginających wiązań C-N-H oraz od drgań wahadłowych wiązań NH_2 w grupie powstałej po pęknięciu wiązania C-N w pierścieniu β -laktamowym. Zaobserwowano również zmiany intensywności i kształtu pasm w zakresie 1100-1200 cm^{-1} , które korespondują ze zmianami w sile oddziaływań pomiędzy C-C i C-N w ugrupowaniu β -laktamowym, co dodatkowo potwierdza nietrwałość tej struktury na działanie promieniowania. Zaobserwowane zmiany w widmach IR siarczanu cefkwinomiu korespondują z największym spadkiem zawartości tej cefalosporyny i dużą zawartością wolnych rodników w próbce poddanej działaniu promieniowania w dawce 25 kGy.

Widma siarczanu cefoseliny poddanego działaniu promieniowania w dawce 25 kGy nie różnią się od widma zarejestrowanego dla jego próbki referencyjnej. Jednakże dla próbki napromieniowanej dawką 400 kGy zauważono istotne zmiany dla pasm położonych przy: 618, 1100-1200 i 1634 cm^{-1} . Pasma przy 618 cm^{-1} związane jest z drganiami wahadłowymi wiązań NH_2 . Szerokie pasmo w zakresie 1100-1200 cm^{-1} ma strukturę złożoną i w jego składzie można wyróżnić: drgania wachlarzowe i wahadłowe wiązań C-H oraz drgania zginające wiązań C-C-H w grupach CH_2 i CH_3 . Pasma przy 1634 cm^{-1} jest mało widoczne i może wiązać się z drganiami nożycowymi wiązań NH_2 w produkcie rozkładu siarczanu cefoseliny.

Analiza widm napromieniowanego dichlorowodorku cefepimu jednowodnego i porównanie ich z widmem próbki nienapromieniowanej wykazała zmiany pasm położonych przy: 880, 1039, 1087, 1231, 1285, 1678 i 1776 cm^{-1} , świadczy o zmianie w obrębie drgań rozciągających wiązań C-C, C-N oraz C=O pierścienia β -laktamowego. Ponadto w próbce poddanej działaniu promieniowania w dawce 400 kGy zaobserwowano pojawienie się dodatkowych pasm (np. przy 1461 cm^{-1}), co może sugerować tworzenie się wiązań C-H. Wszystkie zaobserwowane zmiany pozwalają wykazać, że pierścień β -laktamowy dichlorowodorku cefepimu jednowodnego jest najbardziej podatny na rozkład pod wpływem promieniowania.

Zmiany obserwowane w widmach Ramana, zarejestrowanych dla próbek cefalosporyn przed i po napromieniowaniu są słabo widoczne. Jednakże ich analiza pozwala na wyciągnięcie analogicznych wniosków, jak w przypadku analizy widm FT-IR.

Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)

Wykazano, że krzywe DSC nienapromieniowanych cefalosporyn charakteryzują się:

- jednym endotermicznym pikiem topnienia (ceftiofur sodowy, cefuroksym aksetylu w postaci amorficznej i krystalicznej, siarczan cefoseliny, chlorowodorek cefetamet u piwoksylu),
- dwoma endotermicznymi pikami topnienia (pochodzącymi od dichlorowodoru cefepimu jednowodnego i L-argininy w preparacie Maxipime),
- jednym egzotermicznym pikiem związanym najprawdopodobniej z rozkładem związku (siarczan cefkwinomu).

Dalszej analizie poddano wyłącznie napromieniowane próbki antybiotyków, których krzywe DSC posiadały co najmniej jeden endotermiczny pik topnienia. Tabela 28 przedstawia zaobserwowane kierunki zmian parametrów charakteryzujących piki topnienia (T_{onset} i T_{peak}) oraz entalpię tego procesu ($\Delta H - \Delta H_0$ kGy).

Tabela 28. Zmiany parametrów piku topnienia oraz entalpii tego procesu.

	T_{onset}	T_{peak}	$\Delta H - \Delta H_0$ kGy
	kierunek zmiany		
CFT	↓	↑↓	↑↓
CAA	↓	↓	↑↓
CAK	↑↓	↑↓	↑↓
CSS	↑↓	↓	↓
CFP	↓	↓	↑↓
CFE	↑↓	↓	↑↓

Legenda: ↓ - spadek, ↑ - wzrost, ↑↓ - kierunek nieokreślony

W próbkach badanych cefalosporyn poddanych działaniu promieniowania jonizującego stwierdzono obniżenie temperatury topnienia, proporcjonalnie do zastosowanej dawki, co może być spowodowane powstawaniem produktów radiolizy. A zatem metoda DSC, może obok metody EPR, być przydatnym narzędziem do monitorowania zmian w substancjach leczniczych poddanych napromieniowaniu.

W próbkach badanych cefalosporyn napromieniowanych dawką 25 kGy, największy spadek temperatury topnienia odnotowano dla postaci krystalicznej cefuroksymu aksetylu i dichlorowodoru cefepimu jednowodnego, który wynosił odpowiednio $-5,1^{\circ}\text{C}$ i $-4,3^{\circ}\text{C}$, najmniejszy natomiast dla postaci amorficznej cefuroksymu aksetylu i chlorowodoru cefetametetu piwoksylu.

Dla badanych cefalosporyn nie wykazano korelacji liniowej między temperaturą topnienia T_{onset} i T_{max} oraz entalpią procesu (ΔH) a dawką promieniowania jonizującego.

Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Porównując mikrofotografie SEM badanych cefalosporyn przed i po napromieniowaniu zaobserwowano wystąpienie zmian polegających na większym zbryleniu kryształów (ceftiofur sodowy, siarczan cefkwinomu i cefuroksym aksetylu w formie krystalicznej) oraz na zmianie ich wielkości (siarczan cefoseliny). Natomiast dla napromieniowanych próbek cefuroksymu aksetylu w formie amorficznej, dichlorowodoru cefepimu jednowodnego i chlorowodoru cefetametetu piwoksylu nie zauważono żadnych istotnych różnic.

Proszkowa dyfraktometria rentgenowska (XRPD)

Jak wynika z przedstawionych dyfraktogramów (Ryciny 34-40) ceftiofur sodowy i cefuroksym aksetylu amorficzny mają charakter amorficzny a pozostałe związki mają postać krystaliczną. Porównując otrzymane wyniki dla badanych cefalosporyn przed i po napromieniowaniu, stwierdzono brak istotnych różnic w położeniu i intensywności poszczególnych refleksów na dyfraktogramach zarejestrowanych dla ceftiofuru sodowego, siarczanu cefkwinomu, cefuroksymu aksetylu amorficznego i siarczanu cefoseliny. Zmiany pod wpływem promieniowania zaobserwowano natomiast dla napromieniowanych próbek cefuroksymu aksetylu krystalicznego, dichlorowodoru cefepimu jednowodnego i chlorowodoru cefetametetu piwoksylu. Na ich dyfraktogramach można zauważyć pojawienie się nowych refleksów oraz różnice w intensywności i położeniu już istniejących. Może być to spowodowane zmniejszeniem stopnia krystaliczności badanych antybiotyków pod wpływem promieniowania, jak również zmianami w składzie ilościowym.

Badania mikrobiologiczne

Przeprowadzone badania mikrobiologiczne miały na celu wykazanie, że promieniowanie jonizujące nie ma wpływu na aktywność mikrobiologiczną wybranych cefalosporyn i prowadzi do otrzymania jałowego produktu.

Wykazano, że wszystkie próbki antybiotyków, zarówno te wyjąławiane przez sączenie, jak również sterylizowane radiacyjnie są jałowe. Stwierdzono także, że metoda wyjąławiania nie wpływa na aktywność mikrobiologiczną badanych cefalosporyn. Wyjątek stanowił napromieniowany siarczan cefoseliny, którego wartość MIC wobec szczepu wzorcowego *Escherichia coli* wzrosła z 0,125 do 0,25 µg/ml, co wiąże się z dwukrotnym zmniejszeniem aktywności bakteriobójczej tego leku.

Analiza chromatograficzna – oznaczenie zawartości badanych cefalosporyn

Do oceny zawartości badanych substancji przed i po napromieniowaniu oraz do wyznaczenia stałych szybkości rozkładu pod wpływem wiązki o mocy 10 kGy/h, zastosowano metody HPLC lub w przypadku chlorowodoru cefetamet u piwoksylu – UHPLC. Metody HPLC stosowane uprzednio w innych badaniach trwałości poddano rewalidacji pod kątem selektywności. W przypadku metody HPLC do oznaczania dichlorowodoru cefepimu i UHPLC do oznaczania chlorowodoru cefetamet u piwoksylu – opracowane metody zwalidowano oceniając takie parametry jak selektywność, dokładność, precyzja i liniowość. Wyznaczono także granice wykrywalności i oznaczalności badanych substancji.

Stwierdzono, że opracowane metody są selektywne, linowe w badanych zakresach stężeń, dokładne i precyzyjne i na tej podstawie uznano je jako odpowiednie do wyznaczonego celu – oceny zmian stężenia substancji w czasie ekspozycji na promieniowanie jonizujące.

Biorąc pod uwagę zawartość cefalosporyn opisanych w farmakopei, można przyjąć, że powinna ona mieścić się w granicach od 102,0% do 96,0%, w zależności od badanego związku. Z badanych cefalosporyn poddanych działaniu promieniowania jonizującego w dawce 25 kGy, parametr ten spełniały: ceftiofur sodowy, cefuroksym aksetylu amorficzny i siarczan cefoseliny, natomiast siarczan cefkwinomu, cefuroksym aksetylu krystaliczny, dichlorowodorek cefepimu jednowodny oraz chlorowodorek cefetamet u piwoksylu nie spełniały tego parametru.

Stwierdzono, że po ekspozycji na promieniowanie nastąpił spadek zawartości wszystkich badanych związków. Na chromatogramach ceftiofuru sodowego, siarczanu cefkwinomu, cefuroksymu aksetylu amorficznego i krystalicznego, oraz chlorowodoru cefetametopiwoksyli zaobserwowano ponadto pojawienie się nowych pików pochodzących prawdopodobnie od produktów rozkładu. Dla dawki 25 kGy największy spadek zawartości (powyżej 10%) zarejestrowano dla diastereoizomeru A cefuroksymu aksetylu amorficznego i krystalicznego oraz siarczanu cefkwinomu. Najbardziej podatny na rozkład pod wpływem promieniowania w dawce 400 kGy okazały się natomiast diastereoizomer A cefuroksymu aksetylu krystalicznego oraz diastereoizomery A i B cefuroksymu aksetylu amorficznego. Należy również zwrócić uwagę na fakt, iż cefuroksym aksetylu w postaci krystalicznej (CAK) charakteryzuje się większą trwałością niż amorficzna postać tego leku (CAA). Dla próbek CAK zaobserwowano także występowanie różnic (dla dawek promieniowania 25, 100 i 400 kGy) w trwałości poszczególnych diastereoizomerów. Spadek zawartości badanych cefalosporyn nie koreluje z zastosowaną dawką promieniowania.

Analiza chromatograficzna – wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji rozkładu badanych cefalosporyn

W czasie napromieniowania moc źródła wynosiła 10 kGy/s, zatem czas oddziaływania badanych substancji z wiązką elektronów był stosunkowo krótki i wynosił od 2,5 s dla dawki 25 kGy do 40 s dla dawki 400 kGy. Uwzględniając czas napromieniowania i zmiany zawartości badanych cefalosporyn pod jego wpływem możliwe było wyznaczenie stałych szybkości rozkładu k [s^{-1}] oraz $t_{0,1}$ i $t_{0,5}$, czyli czasu w którym ubytek substratu wynosi odpowiednio 10 i 50%. Półlogarytmiczna zależność $c = f(t)$ jest prostoliniowa dla badanych związków, co potwierdza, że rozkład cefalosporyn pod wpływem promieniowania zachodzi zgodnie z modelem kinetyki I rzędu względem stężenia substratu.

Wyznaczone stałe szybkości rozkładu (Tabela 25) wskazują, że związkiem najbardziej podatnym na rozkład pod wpływem promieniowania jonizującego jest postać amorficzna cefuroksymu aksetylu, natomiast najbardziej trwałym związkiem w tych warunkach dichlorowodorek cefepimu jednowodny w preparacie Maxipime.

Badane związki uszeregowane według szybkości rozkładu przedstawiają się następująco:

CFP > CFE > CSS > CFK > CFT > CAK > CAA.

Z pochodnych z tzw. podstawnikiem betainowym, tzn. cefkwinomu, cefoseliny i cefepimu, najmniej odporny na promieniowanie okazał się siarczan cefkwinomu a najbardziej odporny siarczan cefoseliny.

7. Wnioski

1. Promieniowanie jonizujące powoduje powstawanie w próbkach ceftiofuru sodowego, siarczanu cefkwinomu, cefuroksymu aksetylu, siarczanu cefoseliny, dichlorowodorku cefepimu jednowodnego (w preparacie Maxipime) oraz w chlorowodorku cefetamet u piwoksylu wolnych rodników w różnym stężeniu oraz zróżnicowanym czasie życia i wygaszania.
2. Zabarwienie badanych cefalosporyn w fazie stałej pod wpływem promieniowania jonizującego ulegało zmianie, co świadczy o możliwych defektach w sieci krystalicznej i pułapkowaniu wolnych rodników.
3. Zawartość badanych cefalosporyn pod wpływem promieniowania jonizującego w dawce 25 kGy uległa zmniejszeniu w zakresie od 0 do 10,7%, w odniesieniu do próbki niepoddanej działaniu promieniowania.
4. Radiodegradacja badanych cefalosporyn w zakresie dawek od 25 do 400 kGy zachodzi zgodnie z kinetyką reakcji I rzędu względem stężenia substratu.
5. Promieniowanie jonizujące w postaci wysokoenergetycznej wiązki elektronów nie wpłynęło na aktywność przeciwbakteryjną ceftiofuru sodowego, siarczanu cefkwinomu, cefuroksymu aksetylu, dichlorowodorku cefepimu jednowodnym (w preparacie Maxipime) oraz chlorowodorku cefetamet u piwoksylu. Natomiast aktywność bakteriobójcza siarczanu cefoseliny wobec szczepów wzorcowych *Escherichia coli* uległa dwukrotnemu zmniejszeniu.
6. Z sześciu badanych cefalosporyn tylko ceftiofur sodowy może być sterylizowany radiacyjnie.
7. Zastosowanie promieniowania jonizującego do wyjaławiania produktu leczniczego wymaga uwzględnienia jego wpływu nie tylko na substancję leczniczą, ale także na substancje pomocnicze.

8. Streszczenie

Sterylizacja radiacyjna, bazująca na wykorzystaniu promieniowania jonizującego w dawce 25 kGy, może być alternatywnym sposobem uzyskania jałowych substancji leczniczych, jak również preparatów farmaceutycznych. Metoda ta znajduje zastosowanie przede wszystkim w procesie wyjaławiania leków podatnych na rozkład w warunkach podwyższonej temperatury i wilgotności względnej powietrza. Podstawowym ograniczeniem sterylizacji radiacyjnej jest możliwość uszkodzenia wyjaławianego materiału. Konieczne jest więc przeprowadzenie badań pozwalających na ocenę trwałości radiochemicznej każdej substancji, która ma być sterylizowana za pomocą promieniowania jonizującego.

Celem niniejszej pracy jest określenie wpływu promieniowania jonizującego na trwałość i aktywność mikrobiologiczną ceftiofuru sodowego, siarczanu cefkwinomu, cefuroksymu aksetylu, siarczanu cefoseliny, chlorowodoru cefetametu piwoksylu in substantia oraz dichlorowodoru cefepimu jednowodnego w postaci preparatu farmaceutycznego Maxipime, w skład, którego wchodzi także L-arginina.

Badane związki napromieniowano wysokoenergetyczną wiązką elektronów w dawce 25 kGy oraz w dawkach wyższych 50-400 kGy, a następnie poddano badaniom analitycznym, których celem była ocena ewentualnych zmian ich właściwości fizykochemicznych i aktywności mikrobiologicznej.

W pierwszym etapie badań wykorzystano następujące metody bezpośrednie, tzn. nie wymagające wstępnego przygotowania próbki: analiza wagowa i organoleptyczna, metody spektroskopowe (EPR, FT-IR, Raman, XRPD), metoda termiczna (DSC) i inne (SEM).

Analiza wagowa wykazała brak istotnych różnic w masie próbek badanych cefalosporyn przed i po napromieniowaniu co wskazuje, że pod wpływem promieniowania nie powstają lotne produkty rozkładu.

W badaniu organoleptycznym zaobserwowano zależne od dawki pochłoniętego promieniowania, zmiany zabarwienia badanych związków. Postać i zapach badanych leków nie uległy zmianie pod wpływem promieniowania. Tworzenie przez napromieniowane związki przezroczystych i bezbarwnych roztworów dowodzi natomiast, że ekspozycja na

promieniowanie nie skutkuje powstawaniem barwnych produktów radiodegradacji, w tym także barwnych wolnych rodników.

Badanie EPR wykazało, że próbki wszystkich cefalosporyn poddanych działaniu promieniowania jonizującego w dawce 25 kGy wykazują obecność wolnych rodników oraz, że ich ilość w badanych związkach wahała się w zakresie od $3,06 \cdot 10^{15}$ spin/g dla postaci krystalicznej cefuroksymu aksetylu do $110,6 \cdot 10^{15}$ spin/g dla produktu leczniczego Maxipime zawierającego dichlorowodorek cefepimu jednowodny. Zaobserwowano także, duże różnice w czasie życia wolnych rodników dla poszczególnych antybiotyków. Duża ilość i krótki czas życia wolnych rodników w napromieniowanej próbce produktu leczniczego Maxipime może być związany z obecności wody hydratacyjnej i L-argininy w tym preparacie.

Widma FT-IR i Ramana napromieniowanych próbek ceftiofuru sodowego, cefuroksymu aksetylu w postaci amorficznej i krystalicznej i chlorowodoru cefetamet u piwoksylu nie wykazują istotnych różnic w położeniu i kształcie poszczególnych pasm, w odniesieniu do widm zarejestrowanych dla związków nienapromieniowanych. Natomiast zmiany w widmach pozostałych cefalosporyn (siarczanu cefkwinom u, siarczanu cefoseliny i dichlorowodoru cefepimu jednowodnego) wskazują, że strukturą najbardziej podatną na rozkład pod wpływem promieniowania jonizującego jest ugrupowanie β -laktamowe.

Analiza XRPD wskazuje na zmiany stopnia krystaliczności i składu ilościowego dla napromieniowanych próbek cefuroksymu aksetylu krystalicznego, dichlorowodoru cefepimu jednowodnego i chlorowodoru cefetamet u piwoksylu. Dla pozostałych antybiotyków stwierdzono brak istotnych różnic w położeniu i intensywności poszczególnych refleksów na ich dyfraktogramach proszkowych.

Analizie DSC poddano próbki cefalosporyn, które posiadały co najmniej jeden endotermiczny pik topnienia (wszystkie poza siarczanem cefkwinom u). Zaobserwowano zależny od dawki promieniowania spadek temperatury topnienia co może być związane z powstawaniem produktów radiolizy. Nie wykazano natomiast korelacji liniowej między temperaturą topnienia oraz entalpią procesu a zastosowaną dawką promieniowania jonizującego.

Oceniając mikrofotografie SEM badanych związków przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy zaobserwowano niewielkie zmiany polegające na większym zbryleniu kryształów

lub na zmianie ich wielkości dla próbek ceftiofuru sodowego, siarczanu cefkwinomu, cefuroksymu aksetylu w formie krystalicznej oraz siarczanu cefoseliny. W przypadku pozostałych leków nie zauważono istotnych różnic.

Do oceny zmian zawartości analizowanych związków przed i po napromieniowaniu oraz do wyznaczenia stałych szybkości rozkładu pod wpływem promieniowania zastosowano metody chromatograficzne (HPLC i UHPLC). Zaobserwowano, że po napromieniowaniu nastąpił spadek zawartości wszystkich badanych cefalosporyn, który nie korelował jednak z pochłoniętą dawką promieniowania. Wartości stałych rozkładu wskazują, że najbardziej podatny na rozkład pod wpływem promieniowania jest cefuroksym aksetylu w postaci amorficznej, natomiast największą trwałością charakteryzuje się dichlorowodorek cefepimu jednowodny w preparacie Maxipime.

Równoległe do badań fizykochemicznych przeprowadzono badania mikrobiologiczne. Potwierdzono, że wszystkie próbki poddane działaniu promieniowania jonizującego w dawce 25 kGy wykazują jałowość. Wykazano również, że aktywność bakteriobójcza badanych cefalosporyn po napromieniowaniu nie zmieniła się. Wyjątek stanowi siarczan cefoseliny, dla którego aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych zmniejszyła się dwukrotnie.

Podsumowując, wykazano że sterylizacja radiacyjna może być wykorzystana tylko do wyjąławiania ceftiofuru sodowego.

9. Summary

Radiation sterilization, based on the application of ionizing radiation at the dose of 25 kGy can be an alternative way to obtain sterile medicinal substances, as well as pharmaceutical preparations. This method is used primarily in the sterilization of drugs susceptible to degradation under conditions of increased temperature and relative air humidity. The major limitation of radiation sterilization is the possibility of damage to the sterilized material. It is therefore necessary to carry out research allowing the evaluation of radiochemical stability of each substance to be sterilized with ionizing radiation.

The aim of this study is to determine the effect of ionizing radiation on stability and microbiological activity of ceftiofur sodium, cefquinome sulfate, cefuroxime axetil, cefoselis sulfate, cefetamet pivoxyl hydrochloride in substantia and cefepime dihydrochloride monohydrate in Maxipime pharmaceutical preparation, which includes also L-arginine.

The abovementioned compounds were irradiated with high energy electron beam at the dose of 25 kGy and at doses of 50-400 kGy, and then subjected to an analytical studies, in order to evaluate any changes in their chemical, physical and microbiological activity.

In the first stage of the studies the following direct methods, which do not require sample pretreatment were used: gravimetric and organoleptic analysis, spectroscopic methods (EPR, FT-IR, Raman, XRPD), thermal method (DSC) and others (SEM).

Gravimetric analysis showed no significant differences in the weight of the cephalosporin samples before and after irradiation, indicating that during irradiation any volatile decomposition products are formed.

In the organoleptic studies the irradiation dose-dependent color changes of selected cephalosporins were observed. The form and the smell of study compounds were not changed under the influence of radiation. The irradiated compounds gave transparent and colorless solutions what shows, that the exposure to radiation does not result in the formation of colored products of radiolysis, including the colored free radicals.

EPR study showed that samples of all cephalosporins irradiated at the 25 kGy represented the presence of free radicals and that their amount in the test compounds ranged from

$3,06 \cdot 10^{15}$ spin/g for the crystalline form of cefuroxime axetil to $110,6 \cdot 10^{15}$ spin/g for Maxipime preparation containing cefepime dihydrochloride monohydrate. The large differences in the lifetime of free radicals in individual drugs samples were observed. A large number of free radicals with short lifetime in the irradiated Maxipime sample may be related to the presence of hydration water and L-arginine in this preparation.

FT-IR and Raman spectra of irradiated ceftiofur sodium, cefuroxime axetil in amorphous and crystalline forms and cefetamet pivoxil hydrochloride do not represent significant differences in the position and shape of bands in comparison to the spectra registered for non-irradiated compounds. However, changes in the spectra of other cephalosporins (cefquinome sulfate, cefoselis sulfate and cefepime dihydrochloride monohydrate) show that a β -lactam moiety is the structure which is the most susceptible to degradation caused by ionizing radiation.

XRPD analysis indicates a changes in degree of crystallinity and quantitative composition of the irradiated samples of crystalline form of cefuroxime axetil, cefepime dihydrochloride monohydrate and cefetamet pivoxil hydrochloride. For other antibiotics no significant differences in the position and intensity of individual reflections on their powder diffraction patterns were found.

DSC analysis was carried out for samples of cephalosporins, which had at least one endothermic melting peak (all except cefquinome sulfate). The dose-dependent decrease in the melting point was observed which can be associated with the formation of radiolysis products. There were no linear correlation between the melting point, enthalpy of the process and a dose of radiation.

On SEM images of the tested compounds (ceftiofur sodium, cefquinome sulfate, crystalline form of cefuroxime axetil and cefoselis sulfate) before and after irradiation with the dose of 400 kGy only small changes, involving a wider solidification of the crystal or a change in the size, were noticed. In the case of other compounds no significant differences were observed.

The chromatographic methods (HPLC and UHPLC) were applied to evaluate changes in the content of compounds being before and after irradiation and to determine the rate constants of decomposition under the influence of radiation. It was observed that after irradiation there was a decrease in the content of all tested cephalosporins, which, however, did not correlate

with absorbed radiation dose. The values of rate constants of decomposition show that the most susceptible to degradation under the influence of radiation is amorphous form of cefuroxime axetil, whereas the most stable is cefepime dihydrochloride monohydrate in Maxipime formulation.

Parallely to the physico-chemical, microbiological studies were carried out. The sterility of all antibiotics exposed to the radiation at 25 kGy was confirmed. It was also shown that the bactericidal activity of cephalosporins after irradiation was not changed. The exception is the cefoselis sulfate, for which the activity against gram-negative strains decreased two times.

It was concluded that the ionizing radiation can only be applied for sterilization of ceftiofur sodium.

10. Piśmiennictwo

1. European Pharmacopoeia 8th Edition, Council of Europe, Strasburg, 2014.
2. Halls N.A., *Achieving sterility in medical and pharmaceutical products*, Marcel Dekker Inc., Nowy Jork, 1994.
3. Janicki S., Fiebieg A., Szmitowska M., *Farmacja stosowana. Podręcznik dla studentów farmacji*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Wydanie IV, Warszawa 2008, str. 131, 142-144.
4. Sevilla M. D., Bernhard W. A., *Mechanism of direct radiation damage to DNA*, w: *Radiation chemistry from basics to application in material and life sciences*, EDP Sciences, France, 2008.
5. Morrissey R. F., Herring C. M., *Radiation sterilization: past, present and future*, *Radiat Phys Chem*, 2002; 63: 217-221.
6. Głuszewski W., Zagórski Z.P., Tran Q.K., Cortella L., *Maria Skłodowska Curie - the precursor of radiation sterilization methods*, *Anal Bioanal Chem*, 2011; 400: 1577–1582.
7. Górską-Chrząstek M., Raciborska I., *Historia techniki PET-od cyklotronu przez koincydencję do PET/MR*, Materiały II Ogólnopolskiej Konferencji Radiofarmaceutycznej, Łódź, 9-10 maja 2013 r., s. 49-50.
8. Mehta K., *Trends in radiation sterilization of health care products*, International Atomic Energy Agency. Wiedeń 2008, str.5-6.
9. Marciniec B., Dettlaff K., *Trends in radiation sterilization of health care products*, International Atomic Energy Agency. Wiedeń 2008, str. 188-189.
10. Kowalski J. B., Tallentire A., *A new method for substantiating 25 kGy*, *Med Device Technol*, 2000; 11(4): 22-5.
11. EN 552, *Sterilization of medical devices – validation and routine control of sterilization by irradiation*, European Committee for Standardization, Belgium, 1994.

-
12. ANSI/AAMI/ISO 11137:2006, *Sterilization of health care products – radiation*, ISO International Standard.
 13. Ražem D., *Radiation sterilization of pharmaceuticals: an overview of the literature*, Ed.: Trends in radiation sterilization of health care products str. 175-186, IAEA, Wiedeń, Austria, 2008.
 14. Tilquin B., *Radiosterilization of drugs*, Ed.: Spothem-Maurizot M., Mostafavi M., Douki T., Belloni J. (red.): Radiation chemistry from basics to application in material and life sciences EDP Sciences, Les Ulis, Francja 2008.
 15. Gopal N. G. S., Patel K. M., Sharma G., Bhalla H. L., Wills P. A., Hilmy N., *Guide for radiation sterilization of pharmaceuticals and decontamination of raw materials*, Radiat Phys Chem, 1988; 32: 619 – 622.
 16. Boess C., Bögl K. W., *Influence of radiation treatment on pharmaceuticals-a review: alkaloids, morphine derivatives, and antibiotics*, Drug Dev Ind Pharm, 1996; 22: 495-529.
 17. Boess C., Bögl K.W., *Influence of radiation treatment on pharmaceuticals 12th Int. Meeting on Radiation Processing*, Avignon, March, 25-30, 2001.
 18. Zagorski P. Z., *Steryliczacja radiacyjna IChTJ*, Warszawa 2007.
 19. Babita K.S., Dilip V. P., Indrani B. Das S., Sudhir K.S., *Study on gamma and electron beam sterilization of third generation cephalosporins cefdinir and cefixime in solid state*, Radiat Phys Chem, 2010; 79, 1079-1087.
 20. Yurus S., Ozbey T., Korkmaz M., *ESR investigation of gamma irradiated sulbactam sodium*, J Pharm Biomed Anal, 2004; 3, 35 (5): 971-8.
 21. Basly J.P., Basly I., Bernard M., *ESR spectroscopy applied to the study of pharmaceuticals radiosterilization: cefoperazone*, J Pharm Biomed Anal, 1998; 17 (4-5): 871-5.

-
22. Baslya J.P., Longya I., Bernard M., *Radiosterilization dosimetry by electron-spin resonance spectroscopy: Cefotetan*, Anal Chim Acta, 1998; 359 (1-2): 107-113.
 23. Singh B., Parwate D.V., Shukla S.K., *Radiosterilization of fluoroquinolones and cephalosporins: assessment of radiation damage on antibiotics by changes in optical property and colorimetric parameters*, AAPS PharmSciTech. 2009; 10(1): 34-43.
 24. Katusin-Razema B., Hamitoucheb K., Maltar-Strmečkić N., Kosd K., Pucića I., Britvić-Budicina S., Razema D., *Radiation sterilization of ketoprofen*, Radiat Phys Chem, 2005; 73 (2): 111-116.
 25. Marcinić B., Kozak M., Naskrent M., Hofman M., Dettlaff K., Stawny M., *DSC and EPR analysis of some radiation sterilized alkaloids*, J Ther Anal Calorim, 2010; 102 (1): 261-267.
 26. Pronce T., Tilquin B., *Radiosterilisation et radoracemisation*, J Chim Phys, 1997; 94: 390-394.
 27. Varshney L., Dodke P. B., *Radiation effect studies on anticancer drugs, cyclophosphamide and doxorubicin for radiation sterilization*, Radiat Phys Chem, 2004; 71: 1103- 1111.
 28. Kaczmarek A., Cielecka-Piontek J., Garbacki P., Lewandowska K., Bednarski W., Barszcz B., Zalewski P., Kycler W., Oszczapowicz I., Jelińska A., *Radiation sterilization of anthracycline antibiotics in solid state*, Sci World J, Volume 2013 (2013), Article ID 258758
 29. Marcinić B., Kozak M., Wachowski L., Ogrodowczyk M., *Evaluation of radiostability of some steroid derivatives*, J Therm Anal Calorim, 2003; 73: 473-485.
 30. Marcinić B., Kozak M., Ogrodowczyk M., *Thermal analysis in evaluation of the radiostability of some 1,4-dihydropyridine derivatives*, J Therm Anal Calorim, 2004; 77: 581-596.
 31. Marcinić B., Stawny M., Kozak M., Naskrent M., *The effect of ionizing radiation on chloramphenicol*, J Therm Anal Cal, 2006; 84: 741-746.

-
32. Hryniewicz W., Mészáros J., *Antybiotyki w profilaktyce i leczeniu zakażeń*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001, str. 133, 169- 171.
 33. Campos Muñiz C., Cuadra Zelaya T. E., Rodríguez Esquivel G., Fernández F. J., *Penicillin and cephalosporin production: A historical perspective*, Rev Latinoam Microbiol, 2007; 49: 88 – 98.
 34. Dzierżeniowska D., *Antybiotyki cefalosporynowe*, Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, Wydanie I, Kraków 1997, str. 11-12.
 35. Gest H., *The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek*, Fellows of The Royal Society, Notes Rec R Soc Lond, 2004; 58 (2): 187–201.
 36. Zając M., Pawełczyk E., Jelińska A., *Chemia leków dla studentów farmacji i farmaceutów*, Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Poznań 2006.
 37. Willams D.A., Lemke T.L., *Faye's Principles of Medicinal Chemistry*, Lippincott Willams & Wilkins 2002. Fifth Edition, str. 842-849.
 38. Brunton L., Lazo J.S., Parker K.L., Redakcja naukowa wydania polskiego: Krzemiński T.F., Buczek W., Czuczwar S.J., *Farmakologia Goodmana & Gilman* TOM II, Wydawnictwo Czelej. Wydanie I, Lublin 2007, str. 1223-1230.
 39. Marshall W.F., Blair J.E., *The cephalosporins*, Mayo Clin Proc, 1999; 74: 187-195.
 40. Gustaferrero C.A, Steckelberg J.M., *Cephalosporin antimicrobial agents and related compounds*, Mayo Clin Proc, 1991; 66: 1064-73.
 41. Dzierżanowska D., *Antybiotykoterapia praktyczna*, Wydawnictwo α -medica Press, Wydanie IV, 2008. str. 93-101.
 42. Dzierżanowska D., *Kompendium antybiotyków 2009*, Wydawnictwo α -medica Press, Wydanie III, 2009, str. 63, 64, 66, 72, 73, 79, 87, 91, 94, 98, 101, 110.

-
43. Danysz A., Buczko W., *Kompendium farmakologii i farmakoterapii, Podręcznik dla studentów medycyny*, Wydawnictwo Elsevier Urban & Partner, Wydanie V uzupełnione, Wrocław 2008, str. 435- 440.
 44. Kurzynoga D., Głąbski T., Rusek D., *Ceftobiprol - nowa cefalosporyna 5 generacji*, *Farmacja Polska*, 2010; 66 (1): 19-24.
 45. Del Pozo J.L., Patel R., *Ceftobiprole medocaril: a new generation beta-lactam*, *Drugs of today* 2008; 44: 801-825.
 46. Murthy B., Schmitt-Hoffmann A., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ceftobiprole, an anti-MRSA cephalosporin with broad-spectrum activity*, *Clin Pharmacokinet*, 2008; 47: 21-33.
 47. Ochocki Z., Stańczak A., *Antybiotyki β -laktamowe. Część I*, *Farmacja Pol*, 2005; 61: 10-21.
 48. Janiec W., *Farmakodynamika, podręcznik dla studentów farmacji*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008, str. 1114-1121.
 49. Rzewuska M., *Antybiotykooporność Gram-ujemnych pałeczek wytwarzających beta laktamazy*, *Życie weterynaryjne*, 2009; 84 (3): 199-205.
 50. Janiec W., *Kompendium Farmakologii*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008, str. 418-419, 424-428.
 51. Lambert H.P., O' Grady F.W., *Antybiotyki i chemioterapia*, Wydawnictwo Medyczne, Warszawa 1994, str. 100-112.
 52. Liu X. D., Gao N., Qiao H. L., *Cephalosporin and penicillin cross-reactivity in patients allergic to penicillins*, *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2011; 49: 206-216.
 53. Strona United States National Library of Medicine <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+80370-57-6> (2014.02.17 20:00)
 54. Marshall W.F., Blair J.E., *The cephalosporins*, *Mayo Clin Proc*, 1999; 74: 187-195.

-
55. Charakterystyka produktu leczniczego weterynaryjnego NAXCEL 100 mg/ml (zawiesina do wstrzykiwań dla świń).
 56. Strona Ogólnopolskiego Serwisu Weterynaryjnego <http://www.veterynaria.pl/leki.php?cmd=info&id=719> (2014.02.18 21:55)
 57. Jacobson G. A., Martinod S., Cunningham C. P., *Determination of ceftiofur in bovine plasma by HPLC-DAD*, J Pharm Biomed Anal, 2006; 40 (5): 1249-1252.
 58. Koshy K.T., Cazars A. R., *Controlled Hydrolysis of Ceftiofur Sodium, a Broad-Spectrum Cephalosporin; Isolation and Identification of Hydrolysis Products*, J Pharm Sci, 1997; 86 (3): 389-395.
 59. Sunkara G., Navarre C. B., Kompella U. B., *Influence of pH and Temperature on Kinetics of Ceftiofur Degradation in Aqueous Solutions*, J Pharm Pharmacol, 1999; 51: 249-255.
 60. Lim Y-H., Deok-Hie Y., Yeu-Young K., Kyung-Hoon C., Hye-Sung, *Identification of Ceftiofur Oxidation Products by High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization/Tandem Mass Spectrometry*, Mass Spectrom Lett, 2011, 2 (1): 16-19.
 61. Souza M. J., Souza Filho P. S., Adams A. I. H., Bergold A. M., *Photodegradation Kinetics of Sodium Ceftiofur in Aqueous Solution Determined by LC Method*, The Open Antimicrobial Agents Journal, 2010; 2: 1-7.
 62. Strona ChemNet Global Chemical Network <http://www.chemnet.com/cas/pl/118443-89-3/CEFKWINOME-SULFATE.html> (2014.02.18 21:20)
 63. Strona LookChem http://product.lookchem.com/info/1988121/Cefquinome-sulphate_123766-80-3.html#.UwSZlvswBIA (2014.02.19 12:54)
 64. Limbert M., Isert D., Klesel N., Markus A., Seeger K., Seibert G., Schrinner E., *Antibacterial activities in vitro and in vivo and pharmacokinetics of cefquinome (HR 111V), a new broad-spectrum cephalosporin*, Antimicrob Agents Chemother, 1991; 35(1): 14–19.

-
65. Thomas E., Thomas V., Wilhelm C., *Antibacterial activity of cefquinome against equine bacterial pathogens*, Vet Microbiol, 2006; 115(1-3): 140-7.
66. Shantier S. W., Gadkariem E. A., Adam M. O., Mohamed M. A., *Development of Stability-Indicating Methods for Cefquinome Sulphate*, Int J Biomed Sci, 2013; 9(3): 162–167.
67. Farmakopea Polska X, PTFarm, Warszawa, 2014.
68. Dellamonica P., *Cefuroxime axetil*, Int J Antimicrob Agents, 1994; 4(1): 23-36.
69. Scott L. J., Ormrod D., Goa K. L., *Cefuroxime Axetil*, Drugs, 2001; 61(10): 1455-1500.
70. Ivanovic I., Zivanovic L., Zecevic M., *A stability indicating assay method for cefuroxime axetil and its application to analysis of tablets exposed to accelerated stability test conditions*, J Chrom A, 2006; 1119: 209-215.
71. Zając M., Jelińska A., Dobrowolski L., Oszczapowicz I., *Evaluation of stability of cefuroxime axetil in solid state*, J Pharm Biomed Anal., 2003; 32: 1181-1187.
72. Jelińska A., Dudzińska I., Zając M., Oszczapowicz I., Krzewski W., *The stability of cefuroxime axetil in tablets*, Acta Pol Pharm, 2005; 62(3): 183-187.
73. Jelińska A., Dudzińska I., Zając M., Oszczapowicz I., *The stability of the amorphous form of cefuroxime axetil in solid state*, J Pharm Biomed Anal, 2006; 41: 1075-1081.
74. Farmakopea Japońska XIV. Official Monographs for Parts I, 334.
75. Strona Guidechem <http://www.guidechem.com/reference/dic-29996.html> (2014.02.21 11:40)
76. Giamarellos–Bourboulis E. J., Grecka P., Tsitsika A., Tympanidou Ch., Giamarellou H., *In-vitro activity of FK 037 (Cefoselis), a novel 4th generation Cephalosporin, compared to Cefepime and Cefpirome on nosocomial staphylococci and gram-negative isolates*, Diagn Microbiol Infect Dis, 2000; 36: 185-191.

-
77. Ohtaki K., Matsubara K., Fujimaru S., Shimizu K., Awaya T., Suno M., Chiba K., Hayase N., Shiono H., *Cefoselis, a β -lactam antibiotic, easily penetrates the blood-brain barrier and causes seizure independently by glutamate release*, J Neural Transm, 2004; 111: 1523-1535.
78. Feng Q., Li-mei Z., Ya-xin S., Xiao-jing H., Xu Z., *Pharmacokinetics of cefoselis injection after a single dose in Chinese healthy volunteers*, Chin J Clin Pharm, 2009; 3: 207-210.
79. Zalewski P., Skibiński R., Talaczyńska A., Paczkowska M., Garbacki P., Cielecka-Piontek J., *Stability studies of cefoselis sulfate in the solid state*, J Pharm Biomed Anal, 2015; 114: 222-226.
80. Zalewski P., Cielecka-Piontek J., Jelińska A., *Development and validation of the stability-indicating LC-UV method for the determination of cefoselis sulphate*, Centr Eur J Chem, 2012; 10: 121-126.
81. Zalewski P., Cielecka-Piontek J., Jelińska A., *Stability of cefoselis sulfate in aqueous solutions*, React Kin Mech Catal, 2013; 108: 285-292.
82. Zalewski P., Cielecka-Piontek J., Jelińska A., *Stability of cefoselis sulfate in intravenous solutions*, Asian J Chem, 2013; 25 (13): 7596-7598.
83. Okamoto M. P., Nakahiro R. K., Chin A., Bedikian A., *Cefepime Clinical Pharmacokinetics*, Clinical Pharmacokinetics, 1993; 25(2): 88-102.
84. Barradell L. B., Bryson H. M., *Cefepime*, Drugs, 1994; 47(3): 471-505.
85. Champan T. M., Perry C. M., *Cefepime*, Am J Respir Med, 2003; 2(1): 75-107.
86. Fubara J. O., Notari R. E., *Influence of pH, temperature and buffers on cefepime degradation kinetics and stability predictions in aqueous solutions*, J Pharm Sci, 1998; 87(12): 1572-1576.
87. Musiał W., Zajac M., *Stability of cefepime dihydrochloride monohydrate in solid state*, Acta Pol Pharm, 2002; 59(4): 243-246.

-
88. Strona PubChem <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=7848692> (2014.02.22 20:54)
89. Anghern P., Hohl P., Then R. L., *In Vitro Antibacterial Properties of Cefetamet and in Vivo Activity of its Orally Absorbable Ester Derivative, Cefetamet Pivoxil*, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1989; 8: 536-543.
90. Koup J. R., Dubach U. C., Brandt R., Wyss R., Stoeckel K., *Pharmacokinetics of Cefetamet (Ro 15-8074) and Cefetamet Pivoxil (Ro 15-8075) after Intravenous and Oral Doses in Humans*, Antimicrob Agents Chemother, 1988; 32(4): 573-579.
91. Jelińska A., Dobrowolski L., Oszczapowicz I., *The influence of pH, temperature and buffers on the degradation kinetics of cefetamet pivoxil hydrochloride in aqueous solutions*, J Pharm Biomed Anal, 2004; 35: 1273-1277.
92. Jelińska A., Zając M., Dobrowolski L., Medenecka B., Ruciński P., Oszczapowicz I., *Kinetics of degradation of cefetamet pivaloyloxymethyl ester and its hydrochloride in solid state*, Acta Pol Pharm, 2003; 60(6): 435-441.
93. CPMP/QWP/054/98 *Annex to Note for guidance on development pharmaceuticals: decisions trees for selection of sterilization methods*, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2000.
94. Morkunas I., Bednarski W., *Fusarium oxysporum-induced oxidative stress and antioxidative defenses of yellow lupine embryo axes with different sugar levels*, J Plant Physiol, 2008; 165: 262-277.
95. M. J. e. Souza¹, D. R. Nogueira, L. M. Silva, M. Z. Arend, P. S. Souza Filho, A. M. Bergold, *Development and Validation of an HPLC Method for Determination of Ceftiofur Sodium*, Chromatographia, 2007; 65: 401-406.
96. Dołhań A., Jelińska A., Manuszewska M., *Stability-Indicating HPLC Method for the Determination of Cefquinome Sulfate*, Acta Pol Pharm, 2014; 71 (2): 249-264.
97. Garbacki P., Cielecka-Piontek J., Zalewski P., Oszczapowicz I., Jelińska A., *A Simple and Sensitive Stability-Indicating UHPLC-DAD Method for the Determination of*

Cefetamet Pivoxil Hydrochloride, Acta Pol Pharm, praca nr 152/14, przyjęta do numeru 1/2016.

98. Miyazaki T., Kaneko T., Yoshimura T., Crucq A.S., Tilquin B., *Electron Spin Resonance Study of Radiosterilization of Antibiotics: Cefazidime*, J Pharm Sci, 1994; 83 (1): 68-71.
99. Żegota H., Koprowski M., Żegota M., *Effect of gamma irradiation on cefotaxime in the solid state*, Radiat Phys Chem, 1995; 45 (2): 223-229.
100. Signoretti Ciranni E., Valvo L., Fattibene P., Onori S., Pantaloni M., *Gamma Radiation Induced Effects on Cefuroxime and Cefotaxime. Investigation on Degradation and Syn-Anti Isomerization*, Drug Dev Ind Pharm, 1994; 20 (16): 2493-2508.
101. Żegota H., Koprowski M., Żegota M., *Stability of Cefuroxime Following Gamma-Irradiation in the Solid State*, Radiat Phys Chem, 1994; 43 (4): 343-348.
102. Jacobs G.P., *The Radiation-Sterilization of Cephalosporins*, Int J Appl Radiat Is, 1980, 31, 91-95.
103. Jacobs G.P., *Stability of Cefazolin and Other New Cephalosporins Following Gamma Irradiation*, Int J Pharm, 1983; 17: 29-38.
104. Crucq A.S., Slegers C., Deridder B., Tilquin B., *Radiosensitivity study of cefazolin sodium*, Talanta, 2000; 52: 873-877.

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. K.Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (www.wbc.poznan.pl).

Poznań, dnia.....

.....

(podpis)

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy.....**doktorskiej**..... p.t.:

"Wpływ sterylizacji radiacyjnej na trwałość wybranych cefalosporyn".

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną, nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem stopnia ...**naukowego: doktor nauk farmaceutycznych**..., a złożona przeze mnie dyskietka/płyta CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

Imię i nazwisko

Data, podpis