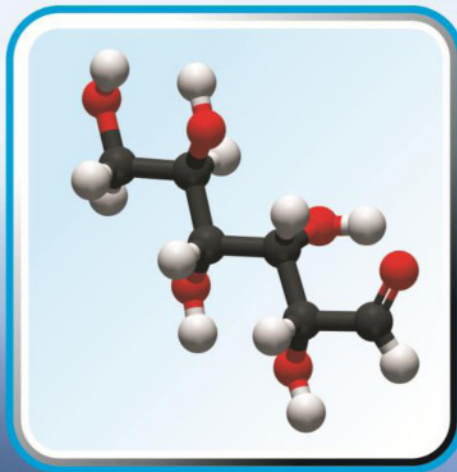



Македонски Фармацевтски Macedonian БИЛТЕН Pharmaceutical Bulletin



57 (suppl) 2011





5-ТИ
КОНГРЕС
НА ФАРМАЦИЈАТА
НА МАКЕДОНИЈА
СО МЕЃУНАРОДНО УЧЕСТВО

ПРЕДГОВОР

Овој број на Македонски фармацевтски билтен е специјален број на списанието посветен на Петтиот Конгрес на фармацијата на Македонија со меѓународно учество.

Во списанието се опфатени апстрактите кои од Научниот одбор се прифатени за презентација на Конгресот.

Апстрактите се печатени во оригиналната форма во која се доставени од авторите, без лекторирање и дополнително техничко обликување или пречукување па поради тоа овој број технички го нема вообичаениот стандард на Македонскиот фармацевтски билтен.

Авторите се потполно одговорни за содржините на нивните соопштенија.

PREFACE

The current issue of the Macedonian pharmaceutical bulletin is a special edition of the Fifth Congress of Pharmacy of Macedonia with International Participation.

The following issue of Macedonian pharmaceutical bulletin contains abstracts accepted by the Scientific Committee for the presentation at the Congress.

Abstracts were printed in their original form as submitted by the authors, without language corrections, technical editing or retyping.

Therefore, the layout doesn't meet the generally agreed upon standards required by the Journal.

Authors are fully responsible for the content of the submitted articles.



DEAR HONORED GUESTS, INVITED SPEAKERS, DELEGATES AND STUDENTS,

On behalf of the Scientific and Organizing Committee it is a pleasure to welcome you to Ohrid for the 5th Congress of Pharmacy in Macedonia with International Participation. The congress is organized as a joint activity of the Macedonian Pharmaceutical Association and Faculty of Pharmacy - Skopje as a quadrennial event since 1995.

This year's conference promises to be our most exciting and rewarding one yet, since more than 800 Pharmacists, among them scientists, educators, policy makers, professionals and the student community will be presenting and discussing some of the major opportunities and challenges affecting the pharmaceutical profession, today.

A great number of oral sessions and poster presentations will give both young and established scientists the opportunity to present their work and share ideas with colleagues on different topics. The opening lecture and the interdisciplinary plenary lectures presented by opinion leaders in particular fields are designed to create starting point for a fruitful congress for researchers, pharmacists and other health professionals. The scientific sessions that follow will start with opening lectures from a leading scientists in a particular field and will cover: I. Pharmaceutical Analysis / Quality Assurance / Regulatory Affairs, II. Pharmaceutical technology and biopharmacy, III. Pharmacoeconomy / Social Pharmacy, IV. Clinical biochemistry / Toxicology / Food and nutrition, V. Medicinal aromatic plants, VI. Clinical pharmacy, VII. Pharmaceutical chemistry / Biomolecular sciences. New trends in academia and education will be discussed during the half day Academic session. Two Workshops organized within the Congress, one on modern analytical techniques and one that will promote Regional ISPOR Chapter Macedonia will further enrich the activities planned for health professionals and scientists interested in those fields. The student session has a goal to introduce our students and other students from the region to experienced pharmaceutical and medical professionals, educators and scientists.

Best oral and poster presentations, selected by a Special Congress Award Committee will be awarded with prizes donated by our general sponsor.

You are invited to submit extended papers for publishing in Macedonian Pharmaceutical Bulletin immediately after the Congress.

We are especially grateful to the dedication of the entire faculty and all other colleagues and collaborators and our sponsors that have accepted to be a part of the Congress activities to ensure that this event is a success

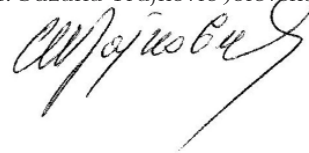
We wish you a successful Congress in Ohrid!

Regards,

Chair of the Scientific Committee
Prof. Katerina Goracinova



Chair of the Organizing Committee
Prof. Suzana Trajkovic Jolevska



ПОЧИТУВАНИ ГОСТИ, ПОКАНЕТИ ПРЕДАВАЧИ, ДЕЛЕГАТИ И СТУДЕНТИ,

Во име на Научниот и Организационен одбор задоволство е да Ви посакам добредојде во Охрид на 5-тиот Конгрес на фармацевти во Македонија со меѓународно учество. Конгресот е организиран од Македонското Фармацевтско Друштво и Фармацевтскиот факултет – Скопје, како настан кој се одржува секои четири години почнувајќи од 1995 година.

Програмата на овогодинашениот Конгрес е доказ за постојаниот напредок и промоција на овој настан. Повеќе од 800 делегати, меѓу нив и научници, професори, експерти и студенти, ќе презентираат и дискутираат за главните можности и предизвици кои ја засегаат фармацевтската професија.

Големиот број на орални и постер презентации, ќе им дадат можност како на младите така и на искусните научници да ја презентираат својата работа и меѓусебно да разменат идеи на различни теми. Воведното предавање и интередисциплинарните пленарни предавања презентирани од експерти во соодветните области ветуваат почеток на успешна работа на научниот дел од Конгресот. Научните секции кои следат, ќе започнат со воведни предавања од врвни научници во: 1. Фармацевтски анализи/ Обезбедување на квалитет/ Регулатива, 2. Фармацевтска технологија и биофармација, 3. Фармакоекономија/Социјална фармација 4. Клиничка биохемија/Токсикологија/Храна и исхрана 5. Медицински ароматични растенија 6. Клиничка фармација 7. Фармацевтска хемија/Биомолекуларни науки.

Во текот на Академската секција, ќе се дискутираат новите трендови во науката и образованието. Во рамките на Конгресот ќе се организираат две работилници. Првата ќе ги обработува современите аналитички техники, а во втората ќе се промовира регионалниот огранок на ISPOR, што дополнително ќе ги збогати активностите планирани за здравствените работници и научниците инволвирани во тие области. Студентската секција има за цел да ги промовира нашите и студентите од регионот, во професионалните, академските и научните кругови.

Најдобрите орални и постер презентации, одбрани од Комисијата за доделување награди и признанија, ќе бидат наградени од нашите генерални спонзори.

По завршување на Конгресот, ги покануваме авторите да поднесат проширена верзија на апстрактите во форма на оригинални научни трудови во Македонскиот Фармацевтски Билтен.

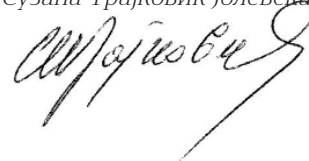
Особено сме благодарни на посветеноста на колегите од Фармацевтскиот Факултет - Скопје, сите останати соработници како и на нашите спонзори, кои прифатија да бидат дел од активностите на Конгресот.

Ви посакуваме успешен Конгрес во Охрид!
Со почит,

Претседател
на Научниот одбор
Проф. Д-р. Катерина Горачинова



Претседател
на Организационен одбор
Проф. Д-р. Сузана Трајковиќ Јолевска



PLENARY LECTURES		1
PL-1	Current trends and future prospects of pharmacoeconomics and outcomes research - with special reference to health technology assessment Finn Boerlum Kristensen	2
PL-2	Perspectives of European and Global Pharmacovigilance Gunilla Sjölin-Forsberg	2
PL-3	European Legislation on Traditional Herbal Medicinal Products Werner Knöss	3
PL-5	Patients; bridging the gap between clinical theory and practical care Sue C. Jones	3
PHARMACEUTICAL ANALYSIS/QUALITY ASSURANCE/ REGULATORY AFFAIRS		5
OP-1	New LC/MS/MS techniques in pharmaceutical analysis Sebastian Kujundžić	6
OP-2	Challenges of Quality Management in Analytical Laboratories L. Ugrinova, K. Brezovska, J. Acevska, A. Poceva Panovska, J. Tonic Ribarska, S. Trajkovic Jolevska, A. Dimitrovska	7
OP-3	Review, evaluation and reporting of analytical results K. Brezovska, J. Acevska, A. Poceva Panovska, J. Tonic Ribarska, L. Ugrinova, S. Trajkovic Jolevska, A. Dimitrovska	9
OP-4	Equipment qualification for quality assurance in analytical laboratory A. Poceva Panovska, K. Brezovska, J. Tonic Ribarska, J. Acevska, L. Ugrinova, S. Trajkovic Jolevska, A. Dimitrovska	11
OP-5	Qualification and Re-qualification of analysts J. Tonic Ribarska, L. Ugrinova, K. Brezovska, J. Acevska, A. Poceva Panovska, S. Trajkovic Jolevska, A. Dimitrovska	13
OP-6	Management of Proficiency Testing Scheme (PTS) J. Acevska, L. Ugrinova, K. Brezovska, A. Poceva Panovska, J. Tonic Ribarska, S. Trajkovic Jolevska, A. Dimitrovska	15
PP-1	An RP-HPLC Study for the pKa Determination of Rizatriptan and its Impurities Biljana Otašević, Mira Zečević, Zorica Vujić and Vesna Kuntić	20
PP-2	Solid-Phase Extraction of Ibuprofen from Pharmaceutical Cream Slavica Sunaric, Milica Petkovic and Marko Denic	21
PP-3	Determination of Doxycycline in Pharmaceutical Samples by HPLC with UV detection Slavica Sunaric, Sandra Stojanovic, Snezana Mitic	21
PP-4	Determination of ketoconazole in pharmaceutical formulations Biljana Gjorgjeska	22
PP-5	Validation and quantification of Bacterial endotoxins in Solutions for haemodialysis AMINAL-100B and AMINAL-100K Elizabeta Popovska, Hristina Babunovska, Silvana Ilioska-Zlatanovic, Maja Simjanovska, Biserka Simonovska	23
PP-6	Development of an HPLC method for related and degradation products in Losartan film coated tablets Marija Spasevska, Gordana Evgenievska, Mena Ivanovska, Tatjana Bogovska, Hristina Babunovska	25
PP-7	Product Quality Review Verce Jovanovska Jankovska, Jasminka Veleska Ivanovska, Sonja Sterjevaska, Miroslava Ilievska	26
PP-8	Five year experience in special quality control in the Croatian agency for medicinal products and medical devices Mikulčić D., Pipić-Kosanović M., Truban Žulj R., Tomić S.	28
PP-9	Analysis of purity in amlodipine tablets in Croatia G. Benković, M. Sokolić, B. Čudina, R. Truban Žulj, S. Tomić	28
PP-10	HPLC methods comparison for related and degradation products in Skopryl (Lisinopril) tablets Cveta Dolikoska, Dafinka Damcevska, Blagica Samarova-Stoev, Ana Aleksandric, Hristina Babunovska	29
PP-11	HPLC method for determination of related and degradation substances in Amlodipine alkaloid® tablets M. Dobrkovic, V. Dubrova-Koceva, S. Naumovska, N. Stojanovska, H. Babunovska	31
PP-12	HPLC method vs. UPLC method for quantitative determination of related substances in Metadon Chloride oral solution 10mg/ml Sanja Despotovska, Mena Ivanoska, Milena Strezovska, Petranka Petrusseva, Hristina Babunovska	32

PP-13	HPLC method vs. UPLC method for quantitative determination of related substances in Cefaclor capsules 500mg Milosh Todorovski, Ana Giceva, Tasika Kovacevic, Slavica Janeva, Hristina Babunovska	33
PP-14	The role of temperature dependence of chromatographic retention coefficient in separation of bile acids into congeneric groups Ana Pilipović, Mihaj Poša, Mladena Lalić	35
PP-15	Validation of Cleaning process for equipment for wet granulation Gordana Evgenievska, Ana Giceva, Miona Manasova, Vasilka Dubrova, Hristina Babunovska	36
PP-16	The quantitative structure-retention relationship (QSRR) analysis of some centrally acting antihypertensives and diuretics in cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis Slavica Filipic, Katarina Nikolic, Irena Vovk, Mitja Krizman, Danica Agbaba	37
PP-17	The effect of pH of the medium on dissolution of Omeprazol in Omezol cps.20mg Dragana Kafedziska, Sonja Naumovska, Blagica Samarova Stoev, Hristina Babunovska	38
PP-18	Quality of glass surfaces cleaning products Olga Ortakova, Agim Ameti, Maja Shishovska, Dejan Stefanovski, Katerina Starkoska	39
PP-19	Determination of Ferulic acid with RP-HPLC method in oral solution containing extract of Ferula assafoetida L. and Viscum album L. Jasmina Slavkovska, Maja Shishovska, Dragica Doneva, Zorica Arsova –Sarafinovska, Katerina Starkoska	40
PP-20	Salting-out effects in the ether extraction of paracetamol G.M. Nikolić, J.V. Živković, A.M. Veselinović, D. Atanasković, D. Vlajin	51
PP-21	Saliva as an alternative matrix for TDM of AEDs: HPLC determination of Carbamazepine and Valproic acid in saliva of epileptic patients J.Tonic–Ribarska, Z.Sterjev, A.Haxhiu, G.Kiteva, E.Cvetkovska, I.Petrov, I.Kuzmanovski, N.Baneva, A.Arsovska, N.Tanovska, Lj.Suturkova, S.Trajkovic-Jolevska	42
PP-22	Optimization of MELC Analysis of Pramipexole and Its Impurities A. Malenović, A. Vemić, N. Kostić, T. Rakić, B. Jančić-Stojanović	45
PP-23	Central composition design in separation of ramipril and hydrochlorothiazide B. Jančić-Stojanović, B. Marković, A. Malenović, T. Rakić, A. Vemić, N. Kostić	46
PP-24	Simultaneous analysis of taxifolin (dihydroquercetin) and Vitamin C by derivative UV spectroscopy and UPLC method Nada Pavicic, Ivan Velikinac, Ljiljana Milovanovic	47
PP-25	Approaching EU - a closer look into European procedures for registration of medicinal products: MRP and DCP Zorica Pejčić, Tanja Nedjic	48
PP-26	Which one is counterfeit drug? Golocorbin-Kon S., Mikov M.	49
PP-27	Determination of all-rac-alpha-tocopherol and all-rac-alpha-tocopheryl acetate (synthetic vitamin E) in cosmetic preparations Biljana Nastova, Sandra Atanasovska, Dragica Doneva, Zorica Arsova–Sarafinovska	50
PP-28	Degradation of Mycophenolate mofetil under oxidative stress conditions Ana Protić, Ljiljana Živanović, Marina Radišić, Mila Laušević	51
PP-29	Validated HPLC method for determination of sildenafil in pharmaceutical dosage forms Z. Poposka, M. Shishovska, K. Starkoska, Z. Arsova–Sarafinovska	52
PP-30	Effect of hydrodynamics on the dissolution test of BCS class II active component formulated as solid dosage form with immediate release Irena Brašnarska, Nataša Karalija, Suzan Memed-Sejfulah, Sanja Simeonovska, jorgji Petruševski, Ema Kikovska-Stojanovska, Biljana Šapkareva, Sonja Ugarkovic	54
PP-31	HPLC method for determination of Diclofenac sodium and its impurities using “core-shell” technology M. Hadzieva, L.Ugrinova, N. Nakov, K. Brezovska, A. P. Panovska, S. T. Jolevska, A. Dimitrovska	57
PP-32	Headspace gas chromatography method for determination of propylene glycol M. Hadzieva, A. Poceva Panovska, K. Brezovska, L. Ugrinova, J. Tonic Ribarska, A. Dimitrovska	60

PP-33	Techniques for the preparation of biological samples: theoretical aspects of SPE S. Petrovski, J. Tonic-Ribarska, S. Trajkovic-Jolevska	63
PP-34	Forced degradation study on Clopidogrel 75 mg film coated tablets as useful tool during analytical method development Ksenija Brzilova, Ana Georgieva, Elena Kazandzievska, Gjorgji Petruševski, Suzan Memed-Sejfulah, Sanja Simeonovska, Biljana Šapkareva, Sonja Ugarkovic	66
PP-35	Development and optimization of a HPLC method for determination of clopidogrel-carboxylic acid, inactive metabolite of clopidogrel, in human plasma L.Bogdanovska, N.Nakov, J.Acevska, S.Trajkovic-Jolevska, A.Dimitrovska, R. Petkovska	68
PP-36	Optimization of method for determination of ACE inhibitors in human plasma based on enzyme-inhibitor binding assay followed by RP-HPLC L.Bogdanovska, N.Nakov, V. Karcev, A. Dimitrovska, R. Petkovska	71
PP-37	Comparison of the hydrodynamic effects on the dissolution rate in the paddle apparatus and its design modifications Blagica Debarlieva, Irena Brasnarska, Ema Kikovska-Stojanovska, Biljana Šapkareva, Sonja Ugarkovic	74
PP-38	Comparison of ion-pair HPLC and HILIC method for determination of cetylpyridinium chloride in pharmaceutical preparation N.Nakov, L.Bogdanovska, L.Ugrinova, M.Hadzieva, R.Petkovska, A.Dimitrovska	77
PP-39	Experimental design of stress testing study for double active component system in drug product Ivana Mickoska, Aleksandra Jovanovik, Biljana Šapkareva, Sonja Ugarkovic, Nataša Anevska-Stojanovska	79
PP-40	Comparison of extraction efficiency of different organic solvents for simplification of Dimenhydranate components quantification M.Piponski, M.Naumovska, I.S.Slavevska, T.Rusevska, I.Mitreski, G.T.-Serafimovska	82
PP-41	Adolor Gripo C as Cold Medicine Preparation – A Real and Permanent Analytical Challenge M.Piponski, T.Rusevska, I.S.Slavevska, B.Vulovska, M.Mindoseva, M.Petreska, G.T.-Serafimovska	83
PP-42	Azithromycine HPLC Quantification Method – Concepts and Testing of Experimental Variables M.Piponski, M.Globocki, I.S.Slavevska, T.Rusevska, B.Vulovska, G.Trendovska-Serafimovska	84
PP-43	Trimetazidine HPLC Method Optimization – Influence of Solubility Prescribed Medium on the Selection of Organic Modifier on Mobile Phase Composition M.Piponski, M.Globocki, I.Mitreski, E.Lazarevska, M.Petreska, K.Andonovska, G.Trendovska.-Serafimovska	86
PP-44	New bylaw on variations of marketing authorizations for medicinal products in the Republic of Macedonia, harmonization with the latest EU regulation Vesna Nasteska-Nedanovska, Ilcho Zahariev, Marija Trajchuleski, Rajna Kostoska	87
PP-45	Classification of medicines as regards their supply, prerequisite for public health protection Merjem Hadjihamza	89
PP-185	HPLC Determination of Ketoprofen residues on manufacturing equipment surfaces in cleaning validation process Katerina Kocova, Irina Batkovska Borozanova, Despina Efremova, Gordana Trendovska Serafimovska	90
PHARMACOECONOMY/SOCIAL PHARMACY/PHARMACoinFORMATICS		93
OP-7	Health Economic Aspects of Diabetes Marcin Czech	94
OP-8	Health technology assessment and pharmacoeconomics today Dinko Vitezić	94
OP-9	Pharmacoeconomy and outcome research: an industry perspective Monika Szkultecka - Debek	95
OP-10	Developing the national framework for good governance in the public pharmaceutical sector Renata Slaveska Raichki, Arta Kuli, Tatjana Kadifkova Panovska and Merjem Hadjihamza	95
OP-11	Cost analysis of the management of diabetes in Albania Besiana Bezhani, Florian Toti, Adriana Çano	97
OP-12	Adjustment and implementation of Croatian P&R model in Macedonia Tonci Buble	98

OP-13	Consumption of the prescription drugs covered by the Health insurance fund: Drugs from group C, J and N by ATC classification Kristina Hristova, Sonja Zlatanovska, Kristina Tosevska	98
OP-14	Drug consumption in Croatia 2007-2009 compared to Norway and Denmark Sasa Zezelic, Pero Draganic, Sinisa Tomic	99
OP-15	Diagnosis Related Groups (DRG) payment model in hospitals and the issue of expensive drugs Gulija M.	100
OP-16	Rational Antibiotic Use in Treatment of Respiratory Infections in Children Under Five Years of Age Marina Petric, Svetlana Nestorovic, Ljiljana Tasic, Ana Sabo	101
OP-17	Research of brand management on Macedonian pharmaceutical market Acevski Stevce	101
OP-18	Internet infovigilance – practical approach in Bulgaria Hristina Lebanova, Malina Bileva, Ilko Getov	102
OP-19	Activities of hospital pharmacists association on European level Tajda Miharija Gala	103
PP-46	Display the top ten drugs by consumption in 2009. year in RS Mirjana Đermanović, Slobodan Stanic, Saša Marić	106
PP-47	Retail and reference prices of twenty most used medicines from the Positive list after the introduction of the reference pricing system in the Republic of Macedonia Bistra Angelovska, Verica Ivanovska, Slavica Maleska Stojadinovik	106
PP-48	Analysis of the Consumption of Magistral and Galenic Medicines from 2001 to 2010 in the Public General Hospital Ohrid Slavica Maleska Stojadinovik, Bistra Angelovska, Verica Ivanovska	108
PP-49	Cost – effectiveness analysis of antimicrobial drugs used in the treatment of acute exacerbations of chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease Acevski Stevce, Sterjev Zoran, Suturkova Ljubica, Zareski Rubin	109
PP-50	Pharmacoeconomic analysis of rivaroxaban for prevention of VTE in patients undergoing elective hip and knee replacement surgery Sterjev.Z, Petrovska Angelovska.A, Gavazova Kozareva.K	111
PP-51	Assessment report of adverse drug reaction received by healthcare professionals Jasmina Babic, Marko Eric, Jelena Pilic	112
PP-52	Patient Package Insert Vlacho B., Naumovska Z., Sterjev Z.	113
PP-53	Some issues in procurement of pharmaceuticals in Macedonia Wholesalers' prospective Marija Gulija	114
PP-54	Evaluation of patient from different aged groups about their satisfaction with pharmaceutical community services in R.Macedonia Sterjev Z., Vlaco B., Nestorovska K.A., Naumoska Z., Grozdanova A., Suturkova Lj.	115
PP-55	The importance of Braille alphabet application on drugs packaging Qendro Gentiana, Malaj Ledjan, Hoti Ela	118
PP-56	The role of pharmacists in decreasing antimicrobial resistance Marija Nadazdin, Lela Radakovic, Martika Ivkovic	119
PP-57	E-Marketing – new routes to approach physicians and patients Hristina Lebanova, D.K.Manolov, I. N. Getov	120
PP-58	Blood pressure control in patients with diabetes mellitus type II Roland AntoniĆ, Sandra Vezmar-Kovačević, Snežana Lukić	121
PP-59	Rational antibiotic therapy: what do our patients know? Milica Pešić, Roland AntoniĆ, Gorana Krstić, Gordana Stanisavljević, Snežana Mitić	121
PP-60	Identification of medical needs from primary health care databases in Albania N. Kellici, M. Fida, A. Dibra, M. Miraci, S. Kellici	122

CLINICAL BIOCHEMISTRY/TOXICOLOGY/ FOOD AND NUTRITION		122
OP-20	Fullerenol: Magic bullet or cell killer Rade Injac, Borut Štrukelj	124
OP-21	Derivative spectrophotometry in environmental, food and clinical samples analyses - Evaluation of EP7 monograph K.Karlijkovic-Rajic, B.Markovic	125
OP-22	Viability of L. casei in symbiotic carrot juice during fermentation and storage T. Petreska Ivanovska, L. Petrusevska Tozi, J. Hadzieva, K. Smilkov, N. Geskovski, K. Mladenovska	126
OP-23	Targeted and non-targeted LCMS methods for detection and identification of toxicologically relevant compounds Shaun Bilsborough	129
OP-24	Myeloperoxidase - risk factor for cardiovascular disease Milena Spasovska, Despina Efremova, Silvija Nesova, Tatjana Kadifkova Panovska	129
OP-25	Science as a tool for protecting the working environment: drug and alcohol abuse in the workplace Zoran Kavrakovski, Katerina Jugreva, Biljana Bauer Petrovska	131
OP-26	New trends in biomonitoring: application of RAPD-PCR and Plant Model Systems to Genetic Ecotoxicology Darinka Gjorgieva, Tatjana Kadifkova-Panovska, Saša Mitrev, Biljana Kovacevik, Emilija Kostadinovska	133
OP-27	Fingerprint based prediction of genotoxicity of thiophenes Ksenija Mickova Dimitrova, Igor Kuzmanovski	135
OP-28	Monitoring of persistent organochlorine pesticides in surface water of the Prespa region Tatjana Kadifkova Panovska, Katerina Stojkovska, Renata Slaveska Raicki	136
OP-29	Laboratory Biomarkers in Cardiovascular Medicine Hiljadnikova Bajro M., Kadifkova Panovska T.	137
PP-61	Determination of total lead content in herbal drugs grown on different locations Biljana Kaličanin, Ivana Arsić, Dragan Velimirović, Sonja Naumović	140
PP-62	Determination of Aflatoxins in granular food with Charm II Analyzer Dona Trombeva, Elizabeta Petkovska - Popovska	140
PP-63	GSTP1, GSTM1 and GSTT1 genotypes and serum GST in male COPD Žuntar Irena, Petlevski Roberta, Dodig Slavica, Popović-Grle Sanja	141
PP-64	Characteristics of the water in Lake Ohrid and Biljana springs Robertina Tomevska, Vera Novevska, Lidija Petrusevska-Tozi	142
PP-65	Determination of Aluminum content in Drinking Waters by GFAAS Suzana Angelova, Desa Jakimova, Gligor Manov	143
PP-66	Antioxidant Status and DNA Damage Induced by Heavy Metals in Matricaria recutita L. (Asteraceae) Darinka Gjorgieva, Tatjana Kadifkova-Panovska, Tatjana Ruskovska	144
PP-67	Assessment of Genotoxicity of Xenobiotics by RAPD-PCR Darinka Gjorgieva, Tatjana Kadifkova-Panovska, Saša Mitrev, Emilija Kostadinovska, Biljana Kovacevik	146
PP-68	Drugs may contribute oral-facial clefts in newborn baby Velickova, N., Gacova, M., Kamcev, N., Angelovska, B., Dimova, C.	147
PP-69	Oxidative damage of proteins in plasma of rats exposed to acute oral or intraperitoneal treatment with cadmium Aleksandra Buha, Jelena Kotur-Stevuljevic, Zorica Bulat, Danijela Djukic-Cosic, Jasmina Ivanišević, Vesna Matovic	149
PP-70	Carbon monoxide levels in blood of smokers and non-smokers determined by gas chromatography Aleksandra Buha, Zorica Bulat1, Veljko Petrović, Ivana Jakovljević, Teodora Đikić, Aleksandra Grković, Vesna Matovi	149
PP-71	Trace elements levels in patients on treatment with atypical antipsychotics Bojana Vidović, Brižita Đorđević, Zorica Bulat	150
PP-72	Serum immune response for IgA and IgG antibodies of Helicobacter pylori from patients with gastric difficulties Biserka Simonovska, Elizabeta Popovska, Nikola Simonovski, Slavko Kostoski	151
PP-73	IgA and IgG antibodies - response in diagnosis of Helicobacter pylori infection in patients with gastric symptoms Biserka Simonovska, Elizabeta Popovska, Nikola Simonovski	153

PP-74	CLA-containing food supplements on Bulgarian market Assena Stoimenova, Lili Peykova, Maria Kostova, Stefka Pankova, Kosta Todorov, Lidia Stoycheva, Danka Obreshkova	154
PP-75	Healing of duodenal ulcer after eradication of Helicobacter pylori S. Efremova, D. Efremova	155
PP-76	Examination of glutathione protective role in acute intoxicity by lead and cadmium via activity of the liver endonucleases R.S. Nikolić, J.M. Jovanović, N.S. Krstić, M.N. Stanković, G.M. Kocić	156
PP-77	Quality and safety of additives in meat products Jakimova D., Angelova S., Kadifkova Panovska T.	158
PP-78	Enhanced Health Benefits of Macedonian Red Wines Associated to Color Characteristics, Anthocyanins and Total Polyphenols Maja Dimitrovska, Mirjana Bocevska, Igor Spiroski	159
PP-79	Determination of Coenzyme Q10 Content in Dietary Supplements and Raw Materials using HPLC-DAD Maja Dimitrovska, Biljana Culeva, Anita Najdenkoska	160
PP-80	Justification of the use of fungi in nutrition Mileva Elena, Stefanoska Anita, Biljana Bauer Petrovska	161
PP-81	Biochemical composition of the beverage produced by Japanese crystals Biljana Bauer Petrovska, Svetlana Cekovska, Ljiljana Ugrinova, Biljana Chuleva, Gordana Jankoska	163
PP-82	Levels of some trace elements in some Macedonian Thymus spp. Biljana Bauer Petrovska, Olga Kirovska Cigulevska	165
PP-83	Protective role of salivatic urea in cariogenic processes D. Efremova, M. Spasovska, S. Neshova, T. Kadifkova Panovska	167
PP-84	Creatin Kinaza - MB (CK-MB) isoenzyme, AMI evaluation marker S. Neshova, M. Spasovska, D. Efremova, T. Kadifkova Panovska	169
PP-85	The values of parameters of oxidative status as a possible factor in predicting premature retinopathy Gorica Banjac, Predrag Stojakovic, Marija Slavkovic, Jasmina Ivanisevic, Milica Miljkovic, Tamara Gojkovic, Jelena Kotur-Stevuljevic, Lidija Banjac	170
PP-86	Paraoxonase-1 (PON-1) status in the premature newborn Milica Miljkovic, Tamara Gojkovic, Predrag Stojakovic, Gorica Banjac, Marija Slavkovic, Jasmina Ivanisevic, Jelena Kotur-Stevuljevic, Lidija Banjac	171
PP-87	Longitudinal oxidative stress changes in heart disease children during surgical treatment and acute heart disease exacerbation Slavkovic Marija, Stojakovic Predrag, Banjac Gorica, Ivanišević Jasmina, Miljković Milica, Kotur-Stevuljević Jelena, Vuličević Irena, Vunjak Nevenka, Peco-Antic Amira	171
PP-88	Oxidative stress status in children with pyelonephritis Predrag Stojakovic, Marija Slavkovic, Gorica Banjac, Milica Miljkovic, Jasmina Ivanišević, Jelena Kotur-Stevuljević, Amira Peco-Antić, Duško Paripović, Stanislava Petrović	172
PP-89	Detection of non-dairy fats and oils in dairy products using gas chromatography-mass spectrometry Natalija Krušaravska, Jane Bogdanov	172
PP-90	Validated HPLC-PDA method for determination of tramadol in human serum Snežana Đorđević, Vesna Kilibarda	173

MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS

OP-30	Application of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) methods for structure elucidation of natural products Slobodan Milosavljević	176
OP-31	The survey of species, belonging to Gentianeae family of central Balkans, pharmacognostically interesting Nebojša Menković	177
OP-32	Approaches in pharmacognosy research Gjose Stefkov, Svetlana Kulevanova	177
OP-33	Toxicological risks of herbal medicines Tatjana Kadifkova Panovska and Svetlana Kulevanova	179

OP-34	Antiaggregatory Effect Of Flavonoids Marica Medić-Šarić, Mirza Bojić	180
OP-35	Antimicrobial activity of Pinus peuce Griseb. essential oils Marija Karapandzova, Gjose Stefkov, Elena Trajkovska-Dokik, Ana Kaftandzieva, Svetlana Kulevanova	181
OP-36	Development of novel yeast strains as cell factories for the production of plant terpenoids Ivana Cvetkovikj, Antonios Makris, Codruta Ignea, Gjose Stefkov, Svetlana Kulevanova	183
OP-37	Tools for experimental design and analysis of extraction process for plant matrices Jana Klopcheska, Renata Slaveska Raichki, Vesna Rafajlovska	184
PP-91	Quantitative and multivariate analysis of polyphenolic compounds in Satureja montana L. and S. subspicata Vis. R. Jurišić Grubešić, D. Kremer, I. Kosalec, G. Šepić	188
PP-92	Evaluation of spontane and cultivated flora of "Brigade Palace" park Ajola Mesiti, Liri Dinga	189
PP-93	Fagopyrum esculentum-abiotic elicitation Tůmová L., Martin J.	189
PP-94	Screening of selected Papaveraceae species for cholinesterases inhibition and free radical scavenging activity Macáková Kateřina, Kratochvílová Eva, Chlebek Jakub, Opletal Lubomír	190
PP-95	Flavonoid production in Scutellaria baicalensis bioreactor culture Martin J., Kršková Z., Tůmová L.	191
PP-96	Composition and antimicrobial activity of Heracleum verticillatum essential oils Silvana Petrović, Milica Pavlović-Drobac, Marina Milenković, Marjan Niketić	192
PP-97	Essential oil of Seseli rigidum root Mirjana Marčetić, Branislava Lakušić, Nada Kovačević	192
PP-98	Antioxidant activities of extracts from some Carduus species Dimitrina Zheleva-Dimitrova, Iliya Zhelev, Gerassim Kitanov, Ivanka Dimitrova-Dyulgerova	193
PP-99	Ex-situ collections of endangered medicinal plants Vessela Balabanova, Antonina Vitkova, Ekaterina Kozuharova	193
PP-100	Study of plant extracts activity on different cell lines S. Kellici, B. Jucja, V. Toska, B. Basha, E. Balestrieri, R. Sorrentino, E. Troja, E. Hoti, P. Sinibaldi Vallebona	194
PP-101	Composition of the essential oils of Artemisia alba Turra Dragana Stanisavljević, Mihailo Ristić, Sofija Đorđević, Dragan Veličković, Novica Randelović	195
PP-102	Different methods of extracting capsaicin from Albanian's Capsicum fruits Enkelejda Goci, Ledjan Malaj, Rezarta Shkreli	196
PP-103	Triterpenoid saponins from the roots and in vitro root cultures of Gypsophila species Reneta Gevrenova	196
PP-104	Content of total antioxidants in infusions prepared from medicinal plants frequently used in Republic of Macedonia Tatjana Ruskovska, Darinka Gjorgieva, Marija Crcoroska, Valentina Kukovska	197
PP-105	Variations in the essential oil characteristics of Satureja montana L. (Lamiaceae) depending on environmental conditions and phenological stage Violeta Slavkovska, Mihailo Ristić, Branislava Lakušić and Dmtar Lakušić	199
PP-106	Essential oils composition variability in Salvia officinalis L. from Albania and Kosova V. Papajani-Toska, M. Hatibi, B. Basha, U. Asllani	200
PP-107	Chemical composition of rosemary oils from Albania Vilma Papajani, Klodiola Dylgjeri, Erjon Troja, Entela Haloçi	201
PP-108	Ethnobotanical and ethnomedicinal uses of plants in two regions of Albania Vilma Papajani, Dorina Shengjergji, Mirela Miraçi, Suela Kelliçi, Erina Hilaj	201
PP-109	Evaluation of several methods for the extraction of saponins from Hedera Helix leaf collected in Albania Rezarta Shkreli, Enkelejda Goci	203
PP-110	Preliminary data on analysis of methanol extraction of tubers of Gymnospermium Altaicum subsp. Scipetarum Sokol Abazi, Elmira Mehmeti, Jonida Salihila	203

PP-111	Chemical profile of olive oil with <i>Hypericum Perforatum</i> extracts Sokol Abazi, Jonida Salihila	203
PP-112	Organic compounds in tobacco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) from oriental varieties Klincarska-Jovanovska I, Cvetanovska L, Cvetanovska A, Srbinoska M, Bauer-Petrovska B	204
PP-113	Phytochemical and Biological Studies on Methanol Root Extract of <i>Boerhaavia diffusa</i> Milić N., Aviello G., Čanadanović-Brunet J., Mandić A., Sakač M., Borrelli F.	206
PP-114	Poisonous plants throughout history Biljana Bauer Petrovska, Zoran Kavrakovski	207
PP-115	Determination of total polyphenols in coffee (<i>Coffea</i> sp) and tea (<i>Camellia sinensis</i>) products and coffee and tea beverages Jelena Slavković, Sladjana Šobajić, Tatjana Kundaković	209
PP-116	Volatile Oil Compositions of Some Endemic <i>Hypericum</i> Species of Turkey Esra Eroğlu Özkan, Betül Demirci, Şükran Kültür, Affe Mat, Kemal Hüsnü Can Başer	210
PP-117	Distribution of bioactive flavonoids in <i>Sideritis</i> species used for medicinal "Mountain Tea" in the Balkan countries Jasmina Petreska, Gjoshe Stefkov, Svetlana Kulevanova, Kalina Alipieva, Vassya Bankova, Marina Stefova	210
PP-118	Essential oil composition of Macedonian juniper (<i>Juniperus communis</i> L., Cupressaceae) Floresha Sela, Marija Karapandzova, Gjoshe Stefkov, Svetlana Kulevanov	212
PP-119	The content of minerals in herbs and tea-infusions of Mountain tea (<i>Sideritis scardica</i> and <i>Sideritis raeseri</i>) M. Spaseska, M. Karapandzova, B. Quazimi, G. Stefkov, T. Staflov, K. Baceva, S. Kulevanova	215
PP-120	Antidiabetic and antilipidemic properties of <i>Centaurea erythraea</i> L. (Gentianaceae) Gjoshe Stefkov, Biljana Miova, Suzana Dinevska-Kjovkarovska, Jasmina Petreska, Marina Stefova, Gordana Petrusevska, Svetlana Kulevanova	217
PP-121	Essential oil composition of wild growing Sage from R. Macedonia Gjoshe Stefkov, Ivana Cvetkovikij, Marija Karapandzova, Valbona Krluku, Svetlana Kulevanova	218
PP-122	The content of macro and micronutrients in dried needles and branches of Macedonian pine (<i>Pinus peuce Griseb., Pinaceae</i>) v.s. their content in the plant residue after distillation of essential oil Marija Karapandzova, Gjose Stefkov, Trajče Staflov, Katerina Bačeva, Svetlana Kulevanova	219
PP-183	An Ethnobotanical Study in Kahramanmaraş (Turkey); Wild plants used as economic purpose in Andırın, Kahramanmaraş Serpil Demirci, Neriman Özhatay	221
PP-184	The Use of Wild Edible Plants In The South Part of İzmit (Northwest Turkey) Çağla Kızılarlan, Neriman Özhatay	222
PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY AND BIOPHARMACY		225
OP-38	Medical Device / Drug Combination Products: A Perfect Mix for Biotherapeutics Sema Çaliş	204
OP-39	From Hollow Polymeric Nanoparticles to Entrapped DNA Ivaylo Dimitrov, Elisaveta Petrova, Rahila Kozarova, Margarita Apostolova, Christo B. Tsvetanov	204
OP-40	How well do we understand the behaviour of polymer matrix tablets? Saša Baumagrtner	206
OP-41	Current perspectives on disintegration evaluation of ODT Jachowicz R., Brniak W., Krupa A., Skórka T., Niwiński K.	207
OP-42	Identification of different solid-state modifications of atorva-statin calcium in film-coated tablets by derivative FT-IR spectroscopy Gjorgji Petruševski, Suzan Memed-Sejfulah, Sanja Simeonovska, Marina Kajdzanoska, Irena Brašnarska, Nataša Karalija, Ema Kikovska-Stojanovska, Biljana Šapkareva, Sonja Ugarkovic	209
OP-43	Molecular interactions between selected sodium salts of bile acids and morphine hydrochloride Janoš Čanadi, Mihalj Poša, Gyula Batta	210
OP-44	Swelling and drug release properties of naproxen-loaded Ca-alginate microparticles reinforced with chitosan oligosaccharide B. Calija, N. Cekic, S. Savic, B. Markovic, J. Savic, J. Milic	210

OP-45	Comparison of characteristics of granules and tablets produced in low shear and high shear granulator Sunchica Jordanoska, Krume Toshev, Natasha A. Stojanovska, Ivana Mickoska, Tina Mitrulovska, Sonja Ugarkovic	235
OP-46	Physico-chemical properties of PLGA amphipilic nanoparticles and solid tumor targeting M. Simonoska Crcarevska, N. Geskovski, M. Glavas Dodov, S. Calis, S. Dimcevska, K. Goracinova	238
OP-47	^{99m}Tc radiolabeling of nanoparticles for biodistribution and efficacy studies Geskovski N., Kuzmanovska S., Simonoska Crcarevska M., Glavas Dodov M., Kocovska Zdraveska M., Goracinova K.	240
PP-123	Depyrogenation validation Silvana Ilioska-Zlatanovic, Elizabeta Popovska, Hristina Babunovska, Maja Simjanovska, Dzoko Kungulovski	246
PP-124	The importance of monitoring polymorphic forms of pharmaceutical solids Gordana Zigic, Svetlana Mihaljica, Vesna Poprzen	247
PP-125	Risk analysis as an efficient tool for audit of starting material suppliers Borche Stamoski, Miroslav Popovski, Miroslava Ilievska, Maja Velinovska-Cadinoska, Katerina Aleksievska Beldedovska	248
PP-126	Sterile multidose lidocaine 2 % anesthetic gel – galenic preparation as a replacement of the commercial product T. Dimitrovska Manojlovikj, M. Pavlovska	250
PP-127	GMP in the production of infundibilia M. Pavlovska	251
PP-128	Document Management System as part of computerized systems in Alkaloid AD Verce Jovanovska Jankovska, Nada Popstefanova, Elizabeta Karadzinska, Darko Atanasoski, Miroslava Ilievska	253
PP-129	Risk Management for Solution for Haemodialysis Amino 100B Nada Popstefanova, Svetlana Trajkoska Dabevska, Ornela Kuzmanovska, Sonja Sterjevska	254
PP-130	Analysis of liposomes with resveratrol and vitamin C and E Atanacković M, Cvejić J, Bursać M, Lj. Gojković-Bukarica, H. Heinle	255
PP-131	Physical stability analysis of total parenteral nutrition admixture Marija Pavlovic, Mirjana Antunovic, Dusica Mirkovic, Aleksandar Petrovic	256
PP-132	The update of cosmetic legislation in the Southern Balkan countries, as a necessity in order to have safe and effective cosmetic products Mirela Miraci, Brunilda Basha Suela Kellici, Vilma Toska	257
PP-133	A comparison between Ranitidine 150mg film-coated tablets of different Balcan manufacturers with the patented drug using 'in vitro' dissolution test Ledjan Malaj, Delina Hudhra	258
PP-134	A comparison between DSC and HPLC methods in assessing drug-excipient compatibility Ela Hoti, Ledjan Malaj, Suela Kelliçi, Piera Di Martino	259
PP-135	Compounding sorbitol-mannitol irrigan for transurethral surgical procedures in hospital pharmacy Elena Najdovska, Zora Veljanova	259
PP-136	Topical preparations of Allicin and Allicin transformers: antimicrobial and anti-irritating effects Vesna Savić, Dušica Ilić, Vesna Nikolić, Ljubiša Nikolić, Mihajlo Stanković, Ljiljana Stanojević, Marija Tasić-Kostov	262
PP-137	The mineral mud in dermocosmetic preparations in Treatment of acne Potpara Zorica, Janković Slobodan	263
PP-138	Legislation and recommendations of the European Union in determining the irritation potential of cosmetic ingredients Milica Stanković, Vesna Savić, Valentina Marinković	263
PP-139	In vitro / In vivo Correlation between Two Lamotrigine Oral Formulations Lalic-Popovic M., Golocorbin-Kon S., Mikov M.	264
PP-140	Influence of particle size on the dissolution rate of atorvastatin calcium tablets E. Adamova, L. Makraduli, R. Dameska, E. Ristevska, L. Iveska, H. Litovin, D. Dimova, A. Sekovanic, M. Anevaska, D. Lepčevska	265
PP-141	Formulation of gastro-resistant tablets with Eudragit® Sonja Dimchevska, Packa Antovska, Bosilka Stefanova, Sonja Ugarkovic	268
PP-142	Evidence Based Homeopathy - Scientific Framework of Homeopathy Drugs Preparations in Homeopathic Materia medica Vesna Simonova, Dora Pachova	269

PP-143	Supplier qualification – approach through risk assessment Snezana Vecerkov Vukmirovic	270
PP-144	Preformulation studies of Zolpidem tablets Packa Antovska, Gjorgji Petruševski, Sonja Dimčevska, Bosilka Stefanova, Sonja Ugarković	272
PP-145	Influence of Different Lactose Monohydrate Supplier on In-process parameters on tablets produced on a rotary tablet press Dejan Kostovski, Krume Toshev, Liljana Krsteska, Sonja Ugarkovic	274
PP-146	Static image analysis study of the morphological properties of crystalline pharmaceutically active ingredient Dejan Kostovski, Gjorgji Petruševski, Liljana Krsteska, Sonja Ugarkovic	277
PP-147	Use of descriptive statistics for evaluation of the tableting process of Zolpidem 5 mg film-coated tablets as a part of concurrent validation Bosilka Stefanova, Packa Antovska, Sonja Dimčevska, Sonja Ugarković, Blagica Debarlieva, Filip Butikoski	280
PP-148	Deviation Management in Integrated Pharmaceutical Quality System Nada Popstefanova, Marija Davcheva, Miroslava Ilievska, Svetlana Trajkoska Dabevska	283
PP-149	Effects of formulation variables on the particle size and viability of L.casei - loaded in whey protein-Ca-alginate microparticles Katarina Smilkov, Tanja Petreska Ivanovska, Lidija Petrusavska Tozi, Anita Grozdanov, Marija Glavas Dodov, Nikola Geskovski, Rumenka Petkovska, Kristina Mladenovska	285
PP-150	Qualification and process validation on blister packaging line Maja Stojevska, Biljana Pavicevic, Sonja Sterjevaska, Darko Atanasovski, Biljana Nanova, Milkica Gligorova	287
PP-151	Influence of excipients on in-process parameters on metronidazole tablets Meri Davceva	289
PP-152	Process capability indexes determination during the validation of the tablets production process Violeta Dinić Milisavljević, Nataša Anevka Stojanovska, Sonja Ugarković, Marija Glavaš Dodov	291
PP-153	Continuous granulation, a new approach in pharmaceutical manufacturing Emilija Spaseska Aleksovska, Aleksandar Aleksovski, Emina Zahirovic	291
PP-154	Formulation optimization of ketoprofen hydrophilic matrix system by using factorial experimental design H. Litovin, R. Dameska, D. Dimova, E. Adamova, A. Sekovanic, E Ristevska, M. Anevka, D. Lepcevska, L. Ivceska, E. Dimitrovska, L. Makraduli	292
PP-155	Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa H. Litovin, K. Goracinova, N. Geskovski, M. Simonoska Crcarevska, S. Dimcevska, K. Mladenovska, M. Glavas Dodov	295
PP-156	Characterization of silica xerogel microparticles as 5-FU carriers for colon cancer therapy B. Djurdjic, N. Geskovski, G. Petruševski, M. Simonoska Crcarevska, M. Glavas Dodov, M. Cvetkovska, K.Goracinova	297
PP-157	Dissolution studies of alpha lipoic acid capsules D. Dimova, R. Dameska, L. Makraduli, E. Adamova, E. Ristevska, M.Anevka, A. Sekovanič, D. Lepčevska, L. Ivčeska, H. Litovin	299
PP-158	Formulation and characterization of amino-functionalized silica particles for budesonide delivery V. Petrovska, K. Goracinova, M. Simonoska Crcarevska, A. Georgieva, N. Geskovski, M. Cvetkovska, M. Glavas Dodov	302
PP-159	Formulation of dental gel with micro particles loaded with tea tree oil, Melaleuca alternifolia M. Stefkova, M. Glavas Dodov, N. Geskovski, M. Simonoska Crcarevska, K. Goracinova	304
PP-160	Strategies for improvement of the EPR effect of PLGA amphiphilic nanoparticles M. S. Crcarevska, N. Geskovski, M. G. Dodov, S. Calis, S. Dimcevska, K. Goracinova	306
PP-161	Pharmacy-based survey of patient experiences and treatment effectiveness of acute diarrhea using probiotics in R. of Macedonia T. Sterjeva, K. Goracinova, M. Glavas Dodov	309
PP-162	Quality control of radiopharmaceutical agent technetium [99mTc] Mebrofenin- as a prerequisite for its application Klimentina Trajkova, Aneta Dimitorvska, Emilija Janevik- Ivanovska	311
pp-162	Quality control of radiopharmaceutical agent technetium [99mTc] Mebrofenin- as a prerequisite for its application Klimentina Trajkova, Aneta Dimitorvska, Emilija Janevik- Ivanovska	311
PP-186	Water Intrusion Test, Advantage and Practical Aspects Kukeska Silvana, Tomovska Elena, Gligorova Milkica	313

CLINICAL PHARMACY		
OP-48	Intravenous immunoglobulin in the treatment of neurological diseases Slobodan Apostolski	316
OP-49	Congenital malformations and pharmacological treatment of epilepsy in pregnancy Gordana Kiteva-Trencevska	316
OP-50	Optimization of ELISA method for determination of serum anti-GM1 antibodies Ana Poceva Panovska, Katerina Brezovska, Aleksandra Grozdanova, Slobodan Apostolski, Ljubica Suturkova	318
OP-51	Characterization of glycoproteins isolated from human peripheral nerve and two Campylobacter jejuni O:19 isolates: enteritis and GBS associated K. Brezovska, A. Poceva Panovska, A. Grozdanova, S. Apostolski, Lj. Suturkova	320
OP-52	Induction of anti-ganglioside antibodies in Guillain-Barre Syndrome animal model Grozdanova Aleksandra, Poceva Panovska Ana, Brezovska Katerina, Trajkovska-Dokić Elena, Apostolski Slobodan, Suturkova Ljubica	323
OP-53	Individualized epilepsy treatment with Carbamazepine and Valproic acid Sterjev.Z, Dimovski A.J., Suturkova Lj	325
PP-163	Potential drug-drug interactions in patients hospitalized in the Infectious Diseases Hospital 'Mother Teresa' in Tirana Klejda Hudhra, Besnik Jucja, Gjergji Minga, Vigan Saliasi	328
PP-164	The impact of antineoplastic drugs on the health of healthcare professionals Vigan Saliasi, Gjergji Minga, Dhurata Tarifa, Klejda Hudhra, Delina Hudhra	328
PP-165	Influence of immunosuppressive therapy on biochemical parameters in kidney transplant patients Nikola Stefanovic, Radmila Velickovic-Radovanovic, Aleksandra Catic-Djordjevic, Tatjana Cvetkovic	329
PP-166	Same target different pathways: Clinical pharmacist and Clinical pharmacologist Golocorbin-Kon S., Lalic-Popovic M., Mikov M.	330
PP-167	Bone mineral density in women with risk factors for osteoporosis Tamara Vojnović, Tanja Lazova, Slobodan Gigov, Ivana Indić, Jelena Živković, Jelena Gigov	330
PP-168	Monitoring the implementation and security of montelukast in children Marija Popović Milenković	331
PP-169	Angiogenesis inhibitors - New approach to treatment of malignant disease Vera Dabanović, Ana Pantović	334
PHARMACEUTICAL CHEMISTRY/BIOMOLECULAR SCIENCES		
OP-54	Electrochemical monitoring of anticancer drugs-DNA interactions by single-use sensor platforms Arzum Erdem	334
OP-55	(Benzamidomethyl)triethylammonium Chloride: A Mild and Versatile Reagent for Benzamidomethylation Emil Popovski	334
OP-56	Antiinflammatory activity and docking studies of some β-hydroxy-β-aryl propanoic acids Jelena Savić, Bojan Marković, Sanda Dilber, Marina Milenković, Milena Jovčić, Brižita Đrđević	334
OP-57	Phenylalanine derivates, new selective ligands for ampa- and kainate receptor subunits of ionotropic glutamate receptors Serafimoska Zorica, Kapedanovska Nestororvska Aleksandra, Suturkova Ljubica, Tommy N. Johansen, Karla Frydenvang	336
PP-170	Arylpiperazines active on 5HT1A receptor - QSAR analysis IvaValkova, Irini Doytchinova	340
PP-171	In vitro study of antimicrobial activity of α,β-unsaturated carboxylic acids and α-bromo-carboxylic acids Sara Filipović, Marina Milenković, Sanda Dilber, Vesna Vitnik, Tanja Jovanović, Željko Vitnik	341
PP-172	Synthesis and investigations of some 8-substituted derivatives of 1,3,7-trimethylxanthine Al. Zlatkov, Pl. Peikov	341

TABLE OF CONTENTS

PP-173	Electrochemical monitoring of anticancer drugs-DNA interactions by single-use sensor platforms Arzum Erdem	342
PP-174	(Benzamidomethyl)triethylammonium Chloride: A Mild and Versatile Reagent for Benzamidomethylation Emil Popovski	342
PP-175	Antiinflammatory activity and docking studies of some β-hydroxy-β-aryl propanoic acids Jelena Savić, Bojan Marković, Sanda Dilber, Marina Milenković, Milena Jovčić, Brižita Đrđević	343
PP-176	Phenylalanine derivates, new selective ligands for ampa- and kainate receptor subunits of ionotropic glutamate receptors Serafimoska Zorica, Kapedanovska Nestororvska Aleksandra, Suturkova Ljubica, Tommy N. Johansen, Karla Frydenvang	346
PP-177	Arylpiperazines active on 5HT1A receptor - QSAR analysis IvaValkova, Irini Doytchinova	346
PP-178	In vitro study of antimicrobial activity of α,β-unsaturated carboxylic acids and α-bromo-carboxylic acids Sara Filipović, Marina Milenković, Sanda Dilber, Vesna Vitnik, Tanja Jovanović, Željko Vitnik	348
PP-178	Synthesis and investigations of some 8-substituted derivatives of 1,3,7-trimethylxanthine Al. Zlatkov, Pl. Peikov	348
ACADEMIC SECTION		
OP-58	PHARMINE - Pharmacy education in Europe Jeffrey Atkinson and Bart Rombaut	356
OP-59	Harmonization and reformation of the Master in Pharmacy study programme at the Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana Irena Mlinarič-Raščan, Mirjana Gašperlin, Borut Božič	356
OP-60	The science and practice in the curricula of the Faculty of Pharmacy at the university "Ss Cyril and Methodius" in Skopje, Macedonia Aleksandar J. Dimovski, K. Mladenovska	357
PP-179	Pharmaceutical care in the curriculum of Faculty of Pharmacy and Biochemistry: past experience and future challenges Ž. Juričić, L. Bach-Rojecky, S. Vladimir-Knežević, R. Jurišić Grubešić	360
STUDENTS SECTION ORAL PRESENTATIONS		
	Titles of oral presentations (in order of appearance)	362
STUDENTS SECTION		
PP-180	Harmful effects of UV radiation on human Daliborka Jovanova, Katerina Andonovska, Biljana Bauer Petrovska	366
PP-181	Use of poppy through the ages Katerina Andonovska, Daliborka Jovanova, Biljana Bauer Petrovska	368
OTHER		
PP-182	Importance of trade marks for pharmaceutical products Katerina Ancevska Netkovska	370



ПЛЕНАРНИ ПРЕДАВАЊА **PLENARY LECTURES**

CURRENT TRENDS AND FUTURE PROSPECTS OF PHARMACOECONOMICS AND OUTCOMES RESEARCH - WITH SPECIAL REFERENCE TO HEALTH TECHNOLOGY ASSESSMENT

Finn Boerlum Kristensen

¹National Board of Health, EUnetHTA
Coordinating Secretariat, Copenhagen

²University of Southern Denmark, Odense, Denmark

Pharmacoeconomics, outcomes research and health technology assessment are composite scientific disciplines that are increasingly used to determine value and inform healthcare decisions.

Pharmacoeconomics refers to the scientific discipline that compares the value of one pharmaceutical drug or drug therapy to another^[1]. It is a sub-discipline of Health economics. A pharmacoeconomic study evaluates the cost (expressed in monetary terms) and effects (expressed in terms of monetary value, efficacy or enhanced health related quality of life) of a pharmaceutical product. Health Related *Quality of Life* refers to how the individual's wellbeing may be impacted over time by a disease, a disability, or a disorder^[2]. It encompasses those aspects of overall quality of life that can be clearly shown to affect health—either physical or mental.

Outcomes research investigates the outcomes of healthcare practices. It has been defined as the study of the end results of health services that takes patients' experiences, preferences, and values into account. It is intended to provide scientific evidence relating to decisions made by all who participate in healthcare^[3].

Health Technology Assessment (HTA) is a multidisciplinary process that summarises information about the medical, social, economic and ethical issues related to the use of health technology in a systematic, transparent, unbiased, robust manner. Its aim is to inform the formulation of safe, effective, health policies that are patient focused and seek to achieve best value. Despite its policy goals, HTA must always be firmly rooted in research and the scientific method^[4].

The *European network for HTA* (EUnetHTA) is developing and testing tools to facilitate European cross-border collaboration in HTA to increase the application, volume, and quality of information for healthcare decision-making at the national level. It is co-financed by the EU Commission and partner institutions in Member States^[5].

REFERENCES

1. Arnold RJG and Ekins S, Time for cooperation in health economics among the modeling community, *Pharmacoeconomics* 2010; 28:609-13.
2. McHorney CA. Health status assessment methods for adults: past accomplishments and future directions. *Annual Rev Public Health* 1999; 20:309-35.
3. Clancy, CM; Eisenberg JM. Outcomes research: measuring the end results of health care. *Science* 1998; 282: 245-6.
4. Kristensen FB, Makela M, Allgurin Neikter S, et al. European network for Health Technology Assessment, EUnetHTA: Planning, development, and implementation of a sustainable European network for Health Technology Assessment. *Int J Technol Assess Health Care* 2009;25(Suppl 2):107-116.
5. Kristensen FB, Lampe K, Chase DL, et al. Practical tools and methods for health technology assessment in Europe: Structures, methodologies, and tools developed by the European network for Health Technology Assessment, EUnetHTA. *Int J Technol Assess Health Care* 2009;25(Suppl 2):1-8.

PERSPECTIVES OF EUROPEAN AND GLOBAL PHARMACOVIGILANCE

Gunilla Sjölin-Forsberg

CIOMS, c/o WHO, 20 Avenue Appia-CH-1211 Geneva 27, Switzerland

The management of pharmacovigilance has shifted from national arenas to more global activities. There is a development to perform more clinical trials in resource-limited countries and national or regional decisions may have an impact globally. To make efforts towards harmonization, common standards (ICH, CIOMS WHO etc) and capacity building is essential. Knowledge about pharmacological mechanisms including pharmacokinetics, metabolism and genetics is a necessary basis for understanding adverse drug reactions. Over the years there has also been a major development in methodologies to detect adverse drug reactions and new knowledge and competence needs to be incorporated into pharmacovigilance. During recent years this also includes communication science and an increased interaction with concerned stakeholders especially patients and representatives of patient organizations. A tendency for a more holistic view on total patient safety has developed, this also being reflected in the agenda of meetings organized by different scientific societies. This holistic view also includes the whole life-cycle of the medicinal product development.

Examples of development and efforts of global initiatives are: The "Pharma package" with inclusion of support of patient reporting of suspected ADRs (European initiative, EU commission), PV in disease-oriented programmes in resource-limited countries and PV toolkit for resource-limited countries (WHO initiative). Melinda and Bill Gates Foundation (US initiative to financially support safety systems in WHO disease programmes of Malaria, Tb, HIV etc.), reflection paper on ethical and GCP aspects of clinical trials of medicinal products for human use conducted in third countries and submitted in marketing authorisation applications to the EMA (EMA initiative), efforts of a global risk minimisation toolkit (CIOMS).

Future needs will be to increase capacity building when it comes to the implementation of standards and development and maintenance of pharmacovigilance systems. Furthermore a harmonization in order to avoid duplication of work and reduce costs seems necessary. The use of resources in an effective manner is further strengthened by continuous development of tools for outcome evaluation of risk minimization measures. Finally there is a need to find ways of fighting counterfeit medicines.

EUROPEAN LEGISLATION ON TRADITIONAL HERBAL MEDICINAL PRODUCTS

Werner Knöss

Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Bonn, Germany

Almost everywhere in the world medicinal plants have been used in health care since ancient times. In Europe, first manuscripts describing medicinal plants were written more than two thousand years ago. Starting from this traditional use, which was often based on ready-to-use receipts, there was a development towards usage of finished herbal medicinal products in central Europe during the 20th century. Whereas selection and documentation of manifold receipts have a long tradition the formal regulation of herbal medicinal products is rather young. In parallel with an increasing scientific knowledge on medicinal plants - which included also the identification of highly active purified compounds of plant origin - a regulatory environment for all medicinal products has been established in Europe. The basic regulatory approach is to control the access to the market and to assess quality, safety and efficacy of medicinal products in order to improve public health and to facilitate supply with medicinal products.

In the European Union national regulations have been replaced step by step by implementation of European legislation. The basic regulatory framework for medicinal products is laid down in the Directive EC 2001/83 (and its amendments). There are specific definitions for herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products (Directive EC 2004/24). The regulatory framework differentiates between marketing authorization of herbal medicinal products and registration of traditional herbal medicinal products, for which the efficacy must be plausible based on their long-standing use instead of being proven by clinical trials. Quality, efficacy (or longstanding use) and safety of these medicinal products have to be proven.

A harmonised scientific evaluation in this field is resulting from the work of the Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) at the European Medicines Agency (EMA). The HMPC has drafted and adopted a series of guidelines which are intended to support assessment of traditional herbal medicinal products and herbal medicinal products considering their particular characteristics. One of the major tasks of the HMPC is to establish community monographs and list entries of herbal substances/preparations or combinations thereof. Such harmonized monographs will facilitate assessment within European procedures, reduce the workload for national competent authorities and contribute to the development of a common market of (traditional) herbal medicinal products in Europe. Currently, about 80 monographs have been finalized and about 20 monographs may be finalized furthermore per year.

With respect to globalization the application of Traditional Medicines is not always restricted to specific regions. Some well-known therapeutic systems (e.g. phytotherapy, homeopathy, Traditional Chinese Medicine) are getting more and more popular all over the world. Generally, according to Directive EC 2001/83 the requirements for quality, efficacy and safety must represent the same standards as usually required for all medicinal products.

In conclusion there is a clear European regulatory framework for medicinal products (directive 2001/83/EC as amended) providing basic definitions and offering two options to bring products into the market: i) registration of traditional herbal medicinal products and ii) marketing authorisation of herbal medicinal products. Beside applications at the national level there are also options for European procedures.

PATIENTS; BRIDGING THE GAP BETWEEN CLINICAL THEORY AND PRACTICAL CARE

Sue C Jones

Institute of Pharmaceutical Sciences, King's College London

From the caring perspective of wellbeing we, as healthcare professionals, exist due to the presence of illness in the world population. More specifically in pharmacy, a major role is to work directly with patients on a number of levels. They may visit a pharmacy with a particular symptom causing some discomfort and worry; here we would triage the patient and recommend a course of action. Commonly, they may have been prescribed some medication for a condition they are suffering. Whether acute or chronic, our responsibility is to ensure that the prescribed medication, in all situations, is suitable for that patient. Being appropriate clinically can have many facets, for example:

- » Is the medication 'safe' in terms of dosing, the patient's pre-existing pathologies, side effects, contra-indications, adverse drug reactions etc?
- » Is the medication effective for this condition in this patient?
- » How can we be sure this is the most optimum treatment for this patient?

Whilst all of these questions are important, conventionally it has been the domain of the prescriber, usually a medical doctor, to diagnose and prescribe and therefore address the majority of these areas.

Traditionally, the role of the pharmacist has been evolving fundamentally from public perception of concocting a recipe to cure all ills to a re-professionalisation with expanding roles and with that, additional responsibilities. In 1990 Hepler and Strand¹ talked about a term 'pharmaceutical care' where they explored how the pharmacist could be more involved in working with patients to improve health outcomes:

'pharmaceutical care involves the process through which a pharmacist cooperates with a patient and other professionals in designing, implementing and monitoring a therapeutic plan that will produce specific therapeutic outcomes for the patient...' ibid 539

Interestingly, their work sparked research globally¹ to expand and enhance the clinical role of a pharmacist leading to a variety of emergent roles and responsibilities for patient care. Lots of this research showed that money could be saved in drug choice; health outcome measures such as morbidity and mortality of patients reduced using pharmacists; working relationships between pharmacists and other healthcare professionals improved; communication barriers reduced etc^{2,3,4,5,6}.

Whilst a huge amount of effort has gone into developing standard operating procedures, clinical governance agendas and standardizing care, somewhere in this situation is the patient themselves visible as a unique entity? The United Kingdom (UK) Government suggested (2010)⁷ regarding patient care that there should be:

'no decision about me, without me' ibid 3

¹ A simple search on 'Google Scholar' yielded over 1.42 million 'hits' (31st July 2011).

In these economic times, making the best use of a diminishing level of resource will become more important. In 2010, the spending review included a 0.5% increase over a five year period so the issue of enhancing pharmaceutical care, prescribing costs and treatment adherence will only become more salient⁹. Perhaps by understanding patients better, it could bring about enhanced care effectiveness through a reduction in costs, as highlighted in the Wanless Report⁹.

However, over a million patient complaints are received to the NHS about the standards of care they receive and how they are forgotten in a system that does not work¹⁰. Somewhere in this mix of pharmaceutical care have the basics of dealing with people been forgotten? Being aware and sensitive to the actual needs of the patient as a holistic being not just a system of pathologies to be dealt with. Therefore by considering the wider perspective of what the patient might be bringing with them to their healthcare, pharmacy could be in a unique position to influence patient outcomes and medication safety.

REFERENCES

1. Hepler C D & Strand L M (1990) Opportunities and responsibilities in pharmaceutical care. *American Journal of Hospital Pharmacy* 47:533-543.
2. Kjeldsen L J, Jensen T B & Jensen J J (2011) Physicians' evaluation of clinical pharmacy revealed increased focus on quality improvement and cost saving. *Danish Medical Bulletin*. 58(5):1-6
3. Schumock G T, Butler M G, Meek P D, Vermeule L C, Arondekar B V & Bauman J L (2003) Evidence of the Economic Benefit of Clinical Pharmacy Services: 1996-2000. *Pharmacotherapy* 23(1):113-132.
4. Bond C A, Raehl C L & Franke T (1999) Clinical Pharmacy Services and Hospital Mortality Rates. *Pharmacotherapy* 19(5):556-564.
5. McMullin S T, Hennenfent J A, Ritchie D J, Huey W Y, Lonergan T P, Schaiff R A, Tonn M E & Bailey T C (1999) A Prospective, Randomized Trial to Assess the Cost Impact of Pharmacist-Initiated Interventions. *Arch Intern Med*. 159:2306-2309.
6. Johnson J A & Bootman J L (1997) Drug-related morbidity and mortality and the economic impact of pharmaceutical care. *Am J Health Syst Pharm* 54:554-558
7. Department of Health (2010) Equity and Excellence; liberating the NHS. HMSO. London
8. HM Treasury H M (2010) Spending Review 2010. The Stationary Office Limited; London.
9. Wanless D & Treasury H M (2002) Securing our Future Health: Taking a Long-Term View. The Stationary Office Limited; London.
10. Anon (2011) NHS patients' complaints procedure must be reviewed 'immediately' (online). [Available: <http://www.guardian.co.uk/society/2011/jun/28/nhs-patients-complaints-review>]. Accessed 31.07.11



**ФАРМАЦЕВТСКИ АНАЛИЗИ /
ОБЕЗБЕДУВАЊЕ КВАЛИТЕТ /
РЕГУЛАТИВА**

орални презентации

**PHARMACEUTICAL ANALYSIS /
QUALITY ASSURANCE /
REGULATORY AFFAIRS**

oral presentations

NEW LC/MS/MS TECHNIQUES IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS

Sebastian Kujundžić

DSP Chromatography d.o.o., Milutina Milankovića 120g, Belgrade, Serbia

Liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) combines the physical separation capabilities of high-performance liquid chromatography (HPLC) or ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) with the mass analysis capabilities of mass spectrometry (MS). LC/MS is used for many applications that require very high sensitivity and specificity, with the goal of specific detection, potential identification, or quantification of compounds within a complex mixture. UHPLC systems are capable to deliver fast and optimal separations, providing speed, resolution, and sensitivity. These performances of UHPLC systems create demands on the mass spectrometer to yield faster, sensitive MS/MS. This practically means that MS systems must have excellent mass accuracy, isotopic fidelity, mass resolving power and acquisition rates. These challenges are met by introducing new technologies in every part of the mass spectrometer. All these demands are clearly demonstrated on Figure 1.

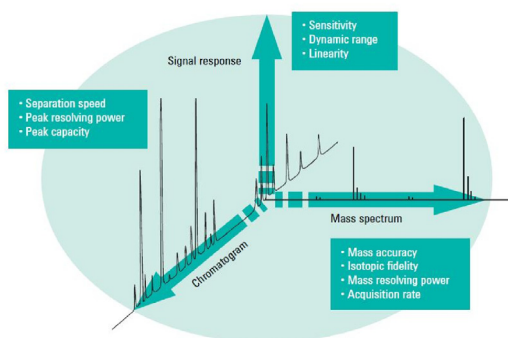
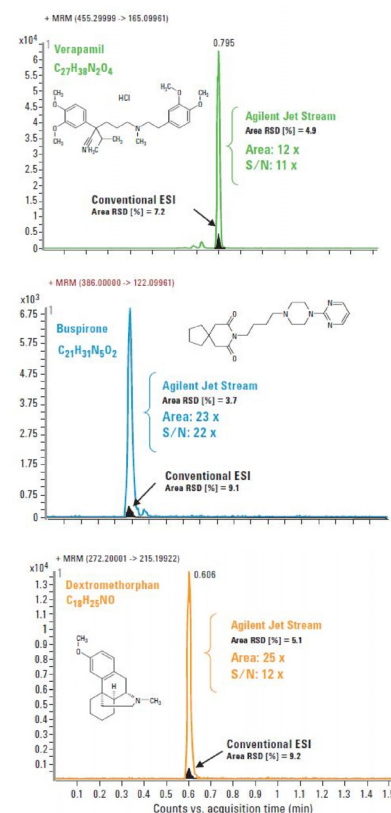


Figure 1 – Clearly Better LC/MS optimizes all analytical dimensions

Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode has become the preferred method for the quantitative analysis of known or target compounds using triple quadrupole mass spectrometry. The current solution for MRM analysis uses time segmentation, where a method is divided into a series of time segments and predefined sets of MRM transitions are monitored for each segment. As sample complexity increases (e.g., quantifying very low levels of many of residues in a wide variety of matrices), very real practical limitations in the time segmentation methodology become apparent. A better solution is required. New dynamic MRM methods on Triple Quadrupole instruments create new capability to tackle large multi-analyte assays and to accurately quantify exceedingly narrow peaks from fast LC separations. Several factors cause fast LC/MS/MS method development in the drug discovery area to be an arduous task. Combination of ESI/APCI sources offers broad response with multiple ionization modes, but optimization can be difficult and some sources limit flow rates to 1 mL/min, while others compromise chromatographic performance. The scan speed of the mass spectrometer needs to be fast enough to acquire an adequate number of data points across the narrow peaks generated using sub-2 μm columns. At typical fast LC conditions, current HPLC systems (pressure limit ~ 400 bar) would yield back pressures

greater than the threshold limit. Using an UHPLC system coupled with an Triple Quadrupole mass spectrometer comprising thermal gradient focusing (Jet Stream Technology – JS) ESI to streamline high-throughput bioanalytical method development using *in vitro* metabolic stability samples. Incubations of the substrates buspirone, verapamil, dextromethorphan, or diclofenac were carried out separately. JS technology was compared to conventional orthogonal ESI using generic source values. The UHPLC/MS/MS system, which allows flow rates up to 2 mL/min, pressures up to 1200 bar, dwell times as low as 1–2 ms, and polarity switching time of 30 ms, achieved an analysis time of less than 1.1 min without sacrificing quantitative data quality. Due to the high data acquisition rate provided by the Triple Quadrupole mass spectrometer, compounds ionizing in positive and negative modes were analyzed in a single run. An adequate number of data points (>10) could be collected across the extremely narrow peaks (Average full width half maximum [FWHM] <1.3 sec) generated by the UHPLC system. JS showed enhanced area response and signal-to-noise in comparison to conventional orthogonal ESI (Figure 2).

Figure 2 - Overlaid MRM chromatograms obtained using JS in comparison to



conventional orthogonal ESI for the metabolic stability study.

This presentation will give an overview of new LC/MS techniques used to get better results in pharmaceutical analysis e.g. an *in vitro* metabolic stability study and pharmacokinetic assay.

REFERENCES

Clearly Better LC/MS Solutions, Application Compendium, Agilent Technologies, 2010.
 Stone P., Glauner T., Kuhlmann F., Miller K., New Dynamic MRM Mode Improves Data Quality and Triple Quad Quantification in Complex Analyses, Technical Overview, Agilent Technologies, 2009.
 Fandino S.A., Extended ionization capability of thermal gradient focusing ESI in high-throughput *in-vitro* ADME, Application Note, Agilent Technologies, 2009.
 Fandino S. A., High-throughput bioanalytical method development using UHPLC/triple quadrupole mass spectrometry, Application Note, Agilent Technologies, 2009.

CHALLENGES OF QUALITY MANAGEMENT IN ANALYTICAL LABORATORIES

L. Ugrinova, K. Brezovska, J. Acevska,
A. Poceva Panovska, J. Tonic Ribarska,
S. Trajkovic Jolevska, A. Dimitrovska

*Center for drug quality control, Faculty of Pharmacy,
University Ss. Cyril and Methodius, Skopje, Macedonia*

QUALITY SYSTEM

Hierarchy of quality stages in laboratory is set with the following quality terms: quality control, quality assurance, quality system, quality improvement and quality management. *Quality control* covers the operational techniques and activities that are used to fulfill requirements for quality and regulatory compliance. *Quality assurance* is defined as planned and systematic activities to provide confidence that an organization fulfills requirements for quality. *Quality system* represents comprehensive and coordinated efforts to meet quality objectives. *Quality improvement* emphasizes the recognizing opportunities for improvement based on the use of quality indicators. *Quality management* is management approach centered on quality, focused on long-term success through customer satisfaction.

Legislation is one of two major forces driving the setting up the quality system in analytical laboratories. The second and more important reason for validation and qualification of analytical laboratory is to improve the reliability, consistency, and accuracy of analytical results. Well-designed, developed, and validated analytical methods, equipment, and materials, together with motivated and qualified people are prerequisites to achieve this goal.

The challenge for any validation plan is to ensure compliance and quality, but with minimal extra cost and administrative complexity. The optimal validation effort is somewhere between doing nothing and the attempt to validate everything 100% [1].

One question that has frequently arisen is: "How much validation is enough?" The real problem lies in the lack of clear guidelines on how to implement regulations and quality standards.

REGULATIONS, STANDARDS, AND GUIDELINES

Analytical laboratories in the chemical and pharmaceutical industries, as well as analytical routine laboratories in other disciplines such as environmental and food analysis, have generally accepted and introduced the appropriate standards, norms, and principles in the analytical process.

Validation and qualification of analytical laboratories are required by many regulations, regulatory guidance documents, quality standards, and company policies.

The most important regulations applying to validations are the good manufacturing practices (GMPs), good clinical practices (GCPs) and good laboratory practices (GLPs) [2,3].

The ICH publishes guidelines as the results of the discussion on scientific and technical aspects of product registration between the regulatory authorities and the experts of Europe, Japan, and the United States [4]. The most important guidelines are those for the validation of analytical methods, stability testing, impurity testing, good manufacturing of APIs, and risk assessment.

The best-known quality standards are the ISO 9000 series, which provide generic standards for development, manufacturing, and service. Most relevant ISO Standard for laboratories is ISO/IEC 17025 [5,6]. The

standard specifies the general requirements for the competence to carry out tests and/or calibrations, including sampling. It covers testing and calibration performed using standard methods, non-standard methods, and laboratory developed methods. The requirements of the standard are segmented into management and technical requirements and are used as a basis for laboratory accreditation.

HOW TO DEAL WITH MULTIPLE REGULATIONS AND QUALITY STANDARDS

Laboratories are frequently faced with a situation where they have to comply with regulations from different countries or with both regulations and quality standards at the same time. The solution to this problem is to combine all regulations and quality standards in a single quality manual and a single set of operating procedures.

Analytical control laboratory within a pharmaceutical company that markets medicinal products in different countries has to work in compliance with the GMPs of the countries in which the drug is marketed. A chemical companies are certified for ISO 9001. The scope of the certification also covers the analytical service laboratory, so the laboratory has to work in compliance with ISO 9001 and with ISO Guide 17025. An independent test laboratory has to comply with ISO 17025 and with GLP and cGMP regulations.

The laboratory management establishes, implements and maintains a quality system appropriate to the scope of its activities, including the type, range and volume of testing and/or calibration, validation and verification activities it undertakes. The laboratory management describes its policies, systems, programmes, procedures and instructions to the extent necessary to enable the laboratory to assure the quality of the test results it generates. Documentation used in this quality system must be communicated and available to, understood and implemented by, the appropriate personnel. The elements of this system must be documented in a quality manual, which is available to the laboratory personnel and must be maintained and updated by a nominated responsible member of the laboratory personnel.

The quality manual should place the laboratory's own quality system first and foremost. This may be based on a well-known quality standard, such as ISO 17025.

ISO 17025 contains all of the requirements that testing and calibration laboratories have to meet if they wish to demonstrate that they operate a management system, are technically competent, and are able to generate technically valid results [6].

The acceptance of testing and calibration results between countries should be facilitated if laboratories comply with this International Standard and if they obtain accreditation from bodies, which have entered into mutual recognition agreements with equivalent bodies in other countries using this International Standard. The use of this International Standard will facilitate cooperation between laboratories and other bodies, and assist in the exchange of information and experience, and in the harmonization of standards and procedures.

REFERENCES

1. Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Informa Healthcare USA, Inc. New York, 2007
2. WHO Good practices for pharmaceutical quality control laboratories, Working document QAS/09.296, 2009
3. Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products: Main Principle Annex 4, WHO Technical Report Series 908, 2003
4. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), www.ich.com.
5. ISO. 9000 Standards Compendium: Quality Management. Geneva Switzerland. 2000.
6. ISO/IEC 17025 "General requirements for the competence of testing and calibration laboratories" Geneva, Switzerland, 2005.

ПРЕДИЗВИЦИ ПРИ УПРАВУВАЊЕ СО КВАЛИТЕТОТ ВО АНАЛИТИЧКИТЕ ЛАБОРАТОРИИ

Л. Угринова, К. Брезовска, Ј. Ацевска, А. Поцева-Пановска, Ј. Тониќ-Рибарска, С. Трајковиќ-Јолевска, А. Димитровска

Центар за испитување и контрола на лекови, Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, Р. Македонија

СИСТЕМ НА КВАЛИТЕТ

Хиерархијата на квалитет во рамки на една лабораторија е утврдена со следните термини: контрола на квалитет, обезбедување на квалитет, систем за квалитет, подобрување на квалитет и управување со квалитет. *Контролата на квалитетот* опфаќа оперативни техники и активности што се користат за да се исполнат барањата за квалитет и регулаторните барања. *Обезбедување на квалитетот* е дефинирано како спроведување на планирани и систематски активности за обезбедување на доверба дека организацијата ги исполнува барањата за квалитет. *Системот за квалитет* опфаќа сѐопфатни и координирани напори за исполнување на целите за квалитет. *Подобрување на квалитетот* става акцент на препознавањето на можностите за подобрување врз основа на индикаторите за квалитет. *Управување со квалитетот* е управување фокусирано на долгорочен успех во задоволување на барањата на корисниците на услуги.

Регулативата е една од двете големи сили што го овозможува воспоставувањето на системот за квалитет во аналитичките лаборатории. Втората и поважна причина е подобрување на сигурноста, конзистентноста и точноста на аналитичките резултати. Добро дизајнирани, развиени и валидирани аналитички методи, квалификувана опрема и материјали, заедно со мотивиран и квалификуван персонал се предуслов за постигнување на оваа цел. Предизвикот за било кој план за валидација е обезбедување на квалитет, но со минимални дополнителни трошоци и најмала административна оптеретеност. Напорот за постигнување на оптимална валидација е во границите помеѓу не спроведување на било каква валидација и обидот да се валидира сѐ (100%) [1].

Прашање што често се поставува е: “До кој степен е потребно да се спроведе валидацијата?” Вистинскиот проблем лежи во недостатокот на јасни насоки за тоа како да се имплементираат регулативите и стандардите за квалитет.

РЕГУЛАТИВИ, СТАНДАРДИ И ВОДИЧИ

Аналитичките лаборатории во рамки на хемиската и фармацевтската индустрија, како и аналитичките лаборатории во други дисциплини, како што се животната средина и храна, имаат воведено соодветни стандарди, норми и принципи во аналитичкиот процес. Валидацијата и квалификацијата на аналитичките лаборатории се бара од страна на многу регулаторни документи, стандарди за квалитет, и политики на компаниите.

Најважните правила што се однесуваат на валидацијата се дефинирани со: Добрата производствена пракса (ДПП), Добрата клиничка пракса (ДКП) и Добрата лабораториска пракса (ДЛП) [2,3]. ИСН водичите за научните и техничките аспекти за регистрација на лековите, се производ на соработката меѓу регулаторните тела и експертите од Европа, Јапонија и САД [4]. Најважни се водичите за валидација на аналитички методи, испитување на стабилност,

испитување на онечистувања, доброто производна пракса во производството на активни супстанции, како и за проценката на ризик. Најпознатите стандарди за квалитет се серијата на ISO 9000, кои ги дефинираат барања за квалитет за развој, производство и услуги. Најрелевантни ISO стандард за лабораториите е ISO/IEC 17025 [5,6]. Овој стандард ги специфицира општите барања за компетентност за извршување на испитување и/или калибрација. Барањата на стандардот се поделени во барања за управување и технички барања. Стандардот се користи како основа за акредитација на лабораториите.

СПРАВУВАЊЕ СО ПОВЕЌЕ РЕГУЛАТОРНИ БАРАЊА И СТАНДАРДИ ЗА КВАЛИТЕТ

Лабораториите често се соочуваат со ситуација каде што треба да се усогласат со регулативите од различни земји и/или со различни стандарди за квалитет во исто време. Решението за овој проблем е комбинирање на сите прописи и стандарди за квалитет во еден прирачник за квалитет.

Контролната аналитичка лабораторија во рамките на една фармацевтска компанија што извезува лекови во различни земји мора да работи во согласност со ДПП на земјите од интерес. Компаниите за производство на хемикалии се сертифицирани за ISO 9001. Но, доколку опсегот на активности опфаќа и услуги во однос на лаборатории за испитување и/или калибрација, компанијата мора да работи во согласност и со ISO 9001 и ISO 17025. Независна лабораторија за контрола, пак мора да работи во согласност со ISO 17025 и со прописите на ДЛП и ДПП.

Раководниот тим на лабораторијата го воспоставува, имплементира и одржува системот за квалитет соодветен на обемот на активностите на лабораторијата. Раководниот тим ги дефинира политиката, системите, програмите, постапките и упатствата до степен потребен за да се овозможи лабораторијата да обезбеди квалитет на резултатите од испитувањето што го спроведува. Документацијата што се користи во системот за квалитет треба да биде достапна, разбирлива и имплементирана од страна на соодветниот персонал.

Елементите на системот за квалитет треба да бидат дефинирани во прирачникот за квалитет, а да се засноваат на добро познатите стандарди за квалитет, како што е ISO/IEC 17025 стандардот [6].

Прифаќање на резултатите од испитување и калибрација помеѓу земјите е возможно ако лабораториите работат во согласност со овој меѓународен стандард и ако се акредитирани од тела што се заемно признаени од еквивалентни тела во други земји во однос на овој меѓународен стандард. Употребата на стандардот ја олеснува соработката помеѓу лабораториите и регулаторните тела, и помага при размена на информации и искуства, како и при усогласување на стандарди и процедури.

ЛИТЕРАТУРА

1. Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Informa Healthcare USA, Inc. New York, 2007
2. WHO Good practices for pharmaceutical quality control laboratories, working document QAS/09.296, 2009
3. Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products: Main Principle Annex 4, WHO Technical Report Series 908, 2003
4. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), www.ich.com.
5. ISO. 9000 Standards Compendium: Quality Management. Geneva Switzerland. 2000.
6. ISO/IEC 17025 “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” Geneva, Switzerland, 2005.

REVIEW, EVALUATION AND REPORTING OF ANALYTICAL RESULTS

K. Brezovska, J. Acevska, A. Poceva Panovska, J. Tonic Ribarska, L. Ugrinova, S. Trajkovic Jolevska, A. Dimitrovska

Center for drug quality control, Faculty of Pharmacy,
University Ss. Cyril and Methodius, Skopje, Macedonia

The analytical laboratory should perform the testing in a quality system based on quality regulations, guidelines and standards in order to guarantee a sufficient level of confidence in the results. The purpose of any chemical analytical measurement is to get consistent, reliable, and accurate data. Many decisions are based on the results obtained from qualitative and quantitative chemical analysis, and it is important to be aware of the quality of the analytical results.

The results of the testing performed in analytical laboratory may have significant consequences for the products involved, especially if a sample is found to be out of specification. Measures taken by the Competent Authority may include recalls, batch rejection, thorough production investigations, refusing of marketing authorisation of the product. If drugs with undetected impurities are distributed, they can have a negative impact on peoples' health. If harmful contaminants in environmental or food samples are not detected, they can be dangerous to the environment or to consumers. In addition, reporting incorrect analytical results at any particular time leads to loss of a laboratory's confidence in the validity of future results. Any laboratory should do its utmost to ensure accurate results within a known level of confidence, and reliable reporting of test results and conclusions of conformity or non-conformity of a product. Validation and qualification of processes and equipment will help to meet this goal [1,2].

TEST RESULTS

Analytical laboratory should have quality control procedures for monitoring the validity of tests performed and results obtained. Standard operating procedure should be established and maintained for protecting the data, and should include definition of raw data, integrity and confidentiality of data entry or collection, data storage, data transmission and data processing. Data obtained from analytical tests should be reviewed and validated by a qualified and authorized person following the standard operating procedures. Final results should be traceable back to the individual who entered the data, or, in cases where data are acquired on-line from an analytical instrument, the instrument should be identified. If changes have been made to any data, the original raw data should not be obscured by these changes.

Checks, preferably performed automatically, should be built into any routine method to identify errors. Requirements for a validity check of data include well-maintained instruments, documented measurement processes, and statistically supported limits of uncertainty [1,3].

Estimation and reporting of uncertainty of measurements

The uncertainty of measurement "*characterises the dispersion of the values that would be reasonably attributed to the measurand*" [4].

According to ISO/IEC 17025: "...*Testing laboratories shall have and shall apply procedures for estimating uncertainty of measurement...*" [3].

The uncertainty of the measurement should be considered in the result for all quantitative measurements.

Both the Eurachem/CITAC Guide [4] and EA guidelines EA 4/16 [5] give two possible approaches for estimation of measurement uncertainties:

- "step-by-step" approach (combined uncertainty) - identifying and quantifying each component which contributes to the overall uncertainty and combining all contributions.
- "overall" approach (overall uncertainty) - data from prior studies originating from defined internal quality control procedures, from method validation, from collaborative studies or from proficiency tests.

The confidence in the result obtained by the laboratories for compliance testing can be assured by the "overall" approach for the estimation of the uncertainty, by the application of the system suitability criteria and by adherence to pre-defined analytical acceptance criteria, provided that a well-functioning quality system is in place [6,7,8].

EVALUATION OF RESULTS

Evaluation of test results is the process by which data are reviewed, checked for plausibility and accuracy and accepted or rejected based on defined procedures [1].

The laboratory should clearly define how, if applicable, averaging of results is performed and how these results are evaluated.

Guideline of the Official Medicine control laboratories (OMCL) network, for evaluation and reporting of results, gives two examples of approaches for pharmacopoeial testing of active substances and one approach when testing the content of active substance in finished products [2].

Out of specification result (OOS result). When the obtained result does not comply with the specifications, an investigation should be conducted in the laboratory, following the standard procedure, to establish whether this result is due to analytical error, the influence of variables unrelated to the product, or whether this result reflects the actual condition of the product tested.

When clear evidence of laboratory error exists, laboratory testing results should be invalidated. When evidence of laboratory error remains unclear, a full-scale OOS investigation should be conducted by the manufacturing firm to determine what caused the unexpected results. A written record of the investigation should be made and should include the conclusions and follow-up [1,2].

REPORTING OF RESULTS

The results should be reported, usually in an analytical test report and should include all the information requested by the customer and necessary for interpretation of the test or calibration results and all information required by the method used.

The information given in the test report should be based on the requirements given in ISO 17025 (Chapter 5.10). The results and the relevant specification should be reported as the mean of a predetermined number of replicates, given with appropriate number of figures and, if applicable, the standard deviation.

The results of each test should be recorded accurately, unambiguously, and objectively and in accordance with any specific instructions in the test methods and requested by customers [3].

REFERENCES

1. Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Informa Healthcare USA, Inc. New York, 2007
2. Evaluation and reporting of results PA/PH/OMCL (07) 28 DEF CORR, OMCL Guideline, 2007
3. ISO/IEC 17025 "General requirements for the competence of testing and calibration laboratories" Geneva, Switzerland, 2005
4. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements, Eurachem / CITAC Guide CG 4, 2007
5. EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing, EA-4/16, 2007

6. Uncertainty of Measurement - Part 1 General OMCL Policy for implementation of Measurement Uncertainty in Compliance Testing PA/PH/OMCL (05) 49 DEF CORR, OMCL Guideline, 2007
7. Uncertainty of Measurement - Part 2 OMCL Policy on the Estimation and Application of Uncertainty in Analytical Measurement. PA/PH/OMCL (07) 106 DEF, OMCL Guideline, 2007
8. Challenges in Analytical Quality Assurance, Springer New York, 2011

ПРЕГЛЕД, ЕВАЛУАЦИЈА И ПРИКАЖУВАЊЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОД АНАЛИТИЧКИТЕ ИСПИТУВАЊА

К.Брезовска, Ј. Ацевска, А. Поцева Пановска,
Ј. Тониќ Рибарска, Л. Угринова,
С. Трајковиќ Јолевска, А. Димитровска

Центар за испитување и контрола на лекови, Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, Р. Македонија

Секоја аналитичка лабораторија, треба да го спроведува испитувањето во рамките на систем на квалитет базиран на регулативи, водичи и стандарди за квалитет, со цел да се добијат доследни, сигурни и точни резултати од испитувањето.

Резултатите од квалитативните и квантитативните испитувања може значително да влијаат на испитуваните производи, посебно ако добиените резултати се надвор од дозволените граници на спецификацијата за квалитет. Во овој случај, соодветните регулаторни органи може да започнат постапка за повлекување или отфрлање на серијата, детална истрага на производството и одбивање на одобрувањето за пуштање во промет на испитуваниот производ. Во спротивно, дистрибуирање на лекови кај кои не се детектирани присутните онечистувања, или неоткривање на опасни контаминанти во животната средина или во примероци од храна може да има негативно влијание на здравјето на луѓето. Дополнително, прикажувањето на неточни резултати од аналитички испитувања во една аналитичката лабораторија, доведува до недоверба во валидноста на идните резултати. Затоа главна цел на секоја аналитичка лабораторија треба да биде обезбедување на точни и веродостојно прикажани резултати од спроведените испитувања, за што е неопходно постојано валидацирање и квалификација на процесите и опремата [1,2].

РЕЗУЛТАТИ ОД ИСПИТУВАЊАТА

Во аналитичката лабораторија треба да се воспостават и применуваат стандардни оперативни процедури, со дефинирани постапки за контрола на квалитетот со цел следење на валидноста на спроведените испитувања и добиените резултати. Во процедурите треба се дефинира начинот на собирање, внесување, чување, трансфер и процесирање на податоците како и постапката на прегледување и валидирање на податоците од страна на квалификуван и авторизиран персонал. Конечните резултати треба да бидат следиви до аналитичарот кој ги внел податоците или во случаи кога податоците се добиени *on-line* од аналитички инструмент, треба да се идентификува истиот. Било какви промени на податоците, не треба да ги прикријат оригиналните сурови податоци.

Во секоја рутинска метода треба да има постапки за проверка на

валидноста на податоците и идентификација на грешките, по можност да се спроведуваат автоматизирани. Барањата за проверка на податоците вклучуваат добро одржувани инструменти, документирани процеси на мерењата и статистички поддржани граници на неодреденост [1,3].

Одредување и прикажување на мерната неодреденост

Мерната неодреденост „ ја карактеризира дисперзијата на вредностите кои разумно би можеле да се додадат на измерената вредност“ [4].

Сопред ISO/IEC 17025 стандардот [3]

„... Лабораториите за испитување треба да имаат и да применуваат процедури за одредување на мерната неодреденост ...“.

Мерната неодреденост треба да се земе во предвид во резултатите од сите квантитативни мерења.

Водичите даваат два можни начина на определување на мерната неодреденост:

„чекор по чекор“ пристап – идентификација и квантификација на секоја компонента што придонесува во вкупната неодреденост и комбинирање на сите учесници во мерната неодреденост.

„свкупен“ пристап – податоци од претходни испитувања според дефинирани интерни процедури за контрола на квалитет, од валидацијата на методот, од заеднички испитувања, или од меѓулабораториски споредби [4,5]. Овој пристап се користи за обезбедување на доверливоста на резултатите од испитувањата во лабораториите за compliance испитување [6,7,8].

ЕВАЛУАЦИЈА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Евалуацијата на резултатите претставува процес со кој се врши преглед на резултатите, проверка на нивната веродостојност и точност и нивно прифаќање или одбивање врз основа на дефинирани процедури [1].

Во секоја лабораторија треба јасно да биде дефинирано како, доколку е можно, е извршено одредување на средната вредност од добиените резултати и како тие резултати се евалуирани.

Водичот на OMCL (Official Medicine control laboratories) мрежата за евалуација и прикажување на резултатите, дава два пристапа за евалуација на резултатите при испитување на фармакопејски супстанции и еден пристап за евалуација на резултатите при испитување на готови производи [2].

Резултати кои отстапуваат од спецификацијата за квалитет

Кога добиениот резултат не одговара на барањата на спецификацијата за квалитет, во лабораторијата треба да се спроведе документирана истрага, според стандардна процедура, со цел да се утврди дали овој резултат се должи на аналитичка грешка, влијание на фактори кои не се поврзани за производот, или добиениот резултат ја рефлектира вистинската состојба на испитуваниот производ. Во случаи кога постои јасен доказ за лабораториска грешка, резултатите од лабораториското испитување се отфрлаат. Кога не може да се докаже лабораториска грешка, се спроведува дополнителна истрага од производителот, со цел да се одреди што е причината за неочекуваните резултати [1,2].

ПРИКАЖУВАЊЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Резултатите треба да бидат прикажани во извештај од аналитичкото испитување и треба да ги содржат сите информации барани од клиентите, податоците неопходни за интерпретација на добиените резултати и информации за користениот метод за испитување, во согласност со барањата на ISO 17025. Резултатите согласно со спецификацијата за квалитет треба да бидат прикажани како средна вредност од претходно утврден број на репликати, даден со

соодветен број на цифри, и доколку е применливо стандардна девијација.

Резултатите од секое испитување треба да бидат евидентирани точно, недвосмислено и објективно, во согласност со специфичните барања на методот или на клиентот [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Informa Healthcare USA, Inc. New York, 2007
2. Evaluation and reporting of results PA/PH/OMCL (07) 28 DEF CORR, OMCL Guideline, 2007
3. ISO/IEC 17025 "General requirements for the competence of testing and calibration laboratories" Geneva, Switzerland, 2005
4. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements, Eurachem / CITAC Guide CG 4, 2007
5. EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing, EA-4/16, 2007
6. Uncertainty of Measurement - Part 1 General OMCL Policy for implementation of Measurement Uncertainty in Compliance Testing PA/PH/OMCL (05) 49 DEF CORR, OMCL Guideline, 2007
7. Uncertainty of Measurement - Part 2 OMCL Policy on the Estimation and Application of Uncertainty in Analytical Measurement. PA/PH/OMCL (07) 106 DEF, OMCL Guideline, 2007
8. Challenges in Analytical Quality Assurance, Springer New York, 2011

EQUIPMENT QUALIFICATION FOR QUALITY ASSURANCE IN ANALYTICAL LABORATORY

A. Poceva Panovska, K. Brezovska, J. Tonic Ribarska, J. Acevska, L. Ugrinova, S. Trajkovic Jolevska, A. Dimitrovska

Center for drug quality control, Faculty of Pharmacy, University Ss. Cyril and Methodius, Skopje, Macedonia

Validation and qualification are important processes for assuring quality in analytical laboratory. They are required in order to improve the reliability, consistency and accuracy of analytical data.

Validation is a quality assurance process of establishing evidence that provides a high degree of assurance that *any procedure, process, equipment, material, activity or system actually leads to the expected results*.^{1,2,3} Qualification is a quality control process that is used to evaluate whether or not a product, service, or *equipment works correctly and leads to the expected results*.² Validation and qualification are ongoing processes and cover the complete lifetime of methods or equipment. Equipment qualification begins when laboratories have a need for new equipment and define specifications and it ends when the equipment is taken out of service.

According to ISO 17025, "equipment and its software used for testing, calibration and sampling shall be capable of achieving the accuracy required and shall comply with specifications relevant to the tests and/or calibration concerned" [4]. Similar requirements are also stated in ICH Guideline Q7 [5].

Process of equipment qualification is represented by 4Q model [6] which includes:

DQ (design qualification) ensure that instruments have performance of all the necessary functions, which will enable them to be successfully implemented for the intended application. The DQ phase should also verify that the vendor can support the equipment during installation and ongoing use. Errors in DQ can have a tremendous technical,

compliance, and business impact, and, therefore, a sufficient amount of time and resources should be invested in the DQ phase.

IQ (installation qualification) establishes that the instrument is delivered as designed and specified, that it is properly installed in the selected environment, and that this environment is suitable for the operation and use of the instrument. A system installation can be verified by analyzing a reference sample under well-characterized conditions. Any changes to the system should be thoroughly recorded and documented and few (hardware, firmware, or software upgrades) will require IQ in order to maintain the qualification process.

OQ (operational qualification) ensures that the equipment's hardware and the computer software meets functional and performance specifications as required for the intended application and as specified in the DQ document. OQ is an important part of the overall equipment qualification process. The careful selection of test items, the test procedures, and acceptance limits is extremely important. Frequency of performing the OQ depends of few factors (type, usage, stability of equipment) but the most important criterion is to make sure that selected test frequency will result in a high probability that the equipment will pass the tests.

PQ (performance qualification) is the process of demonstrating that an instrument consistently performs according to a specification appropriate for its routine use. The purpose of this process is to ensure that the equipment is functioning without problems and that analytical results have the highest probability of being of acceptable quality. The frequency and need for PQ activities should be based on the type of equipment, the instrument's application, and previous experience with the equipment. Examples are system suitability tests and the analysis of quality control samples. In many cases they are enough proof that instruments are suitable for intended use and no additional tests are required [8].

The guideline of OMCL (Official Medicines Control Laboratory) for qualification of the equipment defines the general requirements for the qualification of analytical equipment, in accordance with the requirements of ISO 17025. This document proposes the following four levels of equipment qualification:

- » Selection of instrument and suppliers
- » Installation and release for use
- » Periodic and motivated instrument checks
- » In-use instrument checks

These four levels correspond to the four phases in equipment qualification process previously described as 4Q model. In addition, separate annexes for the qualification of the different equipment types (HPLC, GC, UV-Vis, IR and Automatic Titrators) are given [7].

Computer systems nowadays are non-dividable parts of the analytical laboratory equipment that are widely used for instrument control, data acquisition, data evaluation, document generation and archiving, and information management. Regulatory agencies pay much attention to the validation and use of computers in the regulated environment. The OMCL Guideline on Validation of Computerised Systems outlines general validation principles for computerised systems of OMCLs in accordance with ISO/IEC 17025. The purpose of this validation is to guarantee the confidence in analytical results obtained with each computerised system. A validated system ensures accurate results and reduces the risk of failure of the system.

The reliability of all the instruments and the software used for measuring, processing and reporting data are of great importance, because of their direct impact on product quality and consumer safety. In order to obtain reliable and accurate data every analytical laboratory should conduct the processes of qualification of equipment and

software as an important step towards accomplishing analytical quality assurance [9].

REFERENCES

1. Pharmaceutical Inspection Convention/cooperation Scheme (PIC/S). Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products. Geneva Switzerland. 2006.
2. European Commission. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union: Good Manufacturing Practices. Vol. 4. 2003. <http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/homev4.htm>.
3. World Health Organization. Good Practices for the Manufacture and Quality Control of Drugs, International Drug GMPs, Buffalo Grove, IL., Interpharm Press, Inc., 1993.
4. DIN EN ISO/IEC 17025 (1999) General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Beuth, Berlin
5. ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005) Good manufacturing practice – guide for active pharmaceutical ingredients. <http://www.ich.org>
6. M. Freeman, M. Leng, D. Morrison and R. P. Munden, Pharm. Technol. Eur., November, 1995.
7. OMCL Guideline on Qualification of equipment - Core document PA/PH/OMCL (08) 73 R, OMCL Guideline, 2011
8. Validation and Qualification in Analytical Laboratories, 2007 by Informa Healthcare USA, Inc. New York
9. OMCL Guideline on Validation of Computerised Systems - Core Document PA/PH/OMCL (08) 69 3R, 2009

КВАЛИФИКАЦИЈА НА ОПРЕМА ВО ОБЕЗБЕДУВАЊЕ НА КВАЛИТЕТ ВО АНАЛИТИЧКА ЛАБОРАТОРИЈА

А. Поцева Пановска, К. Брезовска, Ј. Тониќ Рибарска, Ј. Ацевска, Л. Угринова, С. Трајковиќ Јолевска, А. Димитровска
Центар за испитување и контрола на лекови, Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, Македонија

Валидацијата и квалификацијата се важни процеси во обезбедувањето на квалитет во една аналитичка лабораторија. Тие се потребни за да се подобри сигурноста, доследноста и точноста на аналитичките податоци.

Валидацијата претставува процес на обезбедување на квалитет во кој со висок степен на сигурност се докажува дека било која постапка, процес, опрема, материјал, активност или систем ги дава вистинските резултати [1-3]. Квалификацијата е процес на контрола на квалитет кој се користи за да се утврди дали некој продукт, услуга или опрема работи точно и доведува до очекувани резултати [2].

Валидацијата и квалификацијата се тековни процеси и го опфаќаат целокупниот животен век на методите и опремата. Квалификацијата на опремата започнува кога лабораторијата има потреба од нова опрема и ја дефинира спецификацијата за истата, а завршува кога опремата повеќе не се користи. Согласно со ISO/IEC 17025 'опремата и софтверот кои се користат за анализа, калибрација и земање на примероци треба да обезбедат постигнување на бараната точност и да одговараат на спецификацијата за соодветното испитување/или калибрацијата' [4] Слични барања се дадени во ICH водичот Q7 [5]. Процесот на квалификација на опрема е претставен преку моделот 4Q кој вклучува [6]:

Квалификација на дизајн (DQ) со која се обезбедува опремата да ги поседува сите потребни функции кои ќе овозможат истата успешно да се користи за планираната употреба. Дел од оваа фаза е и обезбедување на техничка поддршка од добавувачот за опремата, за време на инсталација и при нејзината тековна употреба. Во DQ фазата неопходно е да се вложат доволно време и ресурси бидејќи

грешките во истата може да имаат огромно техничко, услужно и бизнис влијание.

Инсталационата квалификација (IQ) потврдува дека опремата е доставена како што е дизајнирано и специфицирано и дека е правилно инсталирана во околина која е соодветна за работа и користење на истата. Правилната инсталација на системот може да се верификува преку анализа на референтен примерок во добро дефинирани услови. Секоја промена на системот потребно е целосно да се документира. Кај некои промени (како надградување на хардверот, софтверот или делови од системот) потребна е повторна IQ со цел да се одржи процесот на квалификација.

Оперативната квалификација (OQ) обезбедува хардверот и софтверот на опремата да ги задоволуваат соодветните барања за дадената апликација, специфицирани во DQ. Од големо значење е примероците и постапките за анализа и границите на прифатливост да бидат внимателно одбрани. Фреквенцијата на изведување на OQ зависи од неколку фактори (типот, користењето, стабилноста на опремата) но најважен е избраната фреквенција на изведување на тестовите за OQ да осигура голема веројатност дека опрема ќе го помине тестот.

Квалификација на перформансите (PQ) е процес со кој се докажува дека инструментот работи доследно на спецификацијата за негова рутинска употреба. Целта е да се осигура правилното работење на опремата и висока веројатност дека аналитичките резултати кои се добиваат имаат прифатлив квалитет. Фреквенцијата и потребата за квалификација на перформансите на апаратурата се утврдуваат врз основа на типот на опрема, примената на инструментот и предходното искуство со истиот. Пример за PQ се тестовите за соодветност на системот и анализа на контролни примероци кои најчесто се доволен доказ дека инструментот е соодветен за употреба [8].

Водичот на OMCL (Official Medicines Control Laboratory) за квалификацијата на опрема ги дефинира основните барања за квалификација на аналитичката опрема во согласност со барањата на ISO 17025. Овој документ предложува 4 нивоа на квалификација на опрема:

- » Избор на инструменти и добавувачи
- » Инсталација и пуштање во употреба
- » Периодични и мотивирани проверки на инструментот
- » Проверки на инструментот за време на користење

Овие четири нивоа одговараат на четирите фази во процесот на квалификација на опрема кои предходно беа опишани како модел на 4Q. Како дополненија дадени се анекси кои се однесуваат на различни типови на опрема (HPLC, GC, UV-Vis, IR и автоматски титратори) [7].

Компјутерските системи кои денес се користат во една аналитичка лабораторија се составен дел од опремата. Се користат за контрола на инструментите како и во процесите на добивање и евалуација на податоци, креирање и архивирање на документи и менаџирање на податоци. Регулаторните органи посветуваат особено внимание на валидацијата и користењето на компјутерите. Водичот на OMCL за Валидација на компјутерски системи ги дава основните принципи на валидација на компјутеризирани системи во согласност со ISO/IEC 17025 стандардот. Целта на оваа валидација е да се гарантира доверливоста во аналитичките резултати добиени од секој компјутеризиран систем. Валидацијата на овој систем обезбедува точни резултати и го намалува ризикот од неуспех на системот [9].

Сигурноста на сите инструменти и софтверот кој се користи за мерење, процесирање и прикажување на податоци се од огромно

значање поради нивното директно влијание на квалитетот и сигурноста на производот. Со цел да се добијат сигурни и точни резултат секоја аналитичка лабораторија потребно е да ги спроведува процесите на квалификација на опрема и нејзиниот софтвер како важен чекор во обезбедување на квалитет.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pharmaceutical Inspection Convention/cooperation Scheme (PIC/S). Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products. Geneva Switzerland. 2006.
2. European Commission. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union: Good Manufacturing Practices. Vol. 4. 2003. <http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/homev4.htm>.
3. World Health Organization. Good Practices for the Manufacture and Quality Control of Drugs, International Drug GMPs, Buffalo Grove, IL., Interpharm Press, Inc., 1993.
4. DIN EN ISO/IEC 17025 (1999) General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Beuth, Berlin
5. ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005) Good manufacturing practice – guide for active pharmaceutical ingredients. <http://www.ich.org>
6. M. Freeman, M. Leng, D. Morrison and R. P. Munden, Pharm. Technol. Eur., November, 1995.
7. OMCL Guideline on Qualification of equipment - Core document PA/PH/OMCL (08) 73 R, OMCL Guideline, 2011
8. Validation and Qualification in Analytical Laboratories, 2007 by Informa Healthcare USA, Inc. New York
9. OMCL Guideline on Validation of Computerised Systems - Core Document PA/PH/OMCL (08) 69 3R, 2009

QUALIFICATION AND RE-QUALIFICATION OF ANALYSTS

J. Tonic Ribarska, L. Ugrinova, K. Brezovska, J. Acevska, A. Poceva Panovska, S. Trajkovic Jolevska, A. Dimitrovska

Center for Drug Quality Control, Faculty of Pharmacy, University "Ss Cyril and Methodius", Skopje, Macedonia

The hiring, training, and managing of qualified personnel is the factor of greatest influence in terms of acquiring accurate and reliable data. All of the documentation and specific equipment available in the laboratory aside, consistently good analytical data will not be obtained, should the personnel not be properly qualified and motivated to handle all laboratory activities [1].

REGULATIONS, QUALITY STANDARDS AND GUIDELINES

All quality standards and good laboratory practice (GLP) regulations have chapters on people qualification and training due to the importance of the people factor.

According to GLP, "the laboratory must have sufficient personnel with the necessary education, training, technical knowledge and experience for their assigned function. The personnel should be free from any conflict of interest and pressure that will interfere with the quality of the results" [2].

The ISO/IEC 17025 (Chapter 5.2) claims that "The laboratory management shall ensure the competence of all who operate specific equipment, perform tests and/or calibrations, evaluate results, and sign test reports and calibration certificates. Personnel performing specific tasks shall be qualified on the basis of appropriate education, training, experience and/or demonstrated skills, as required" [3].

The summary of regulatory requirements and recommendations based on common sense is as follows:

- » It is required that personnel be qualified for the job (education, experience, training). Training should enable the performing of assigned tasks.
- » The compulsory character of the training applies to each employee.
- » Training should cover operational tasks, GLP, and quality systems.
- » A company's training program should be described in a policy document, in a master plan, or in the company's quality plan
- » There should be a procedure on how to train individual employees and quality assurance should verify that procedures are followed.
- » An assessment of the efficiency of the training is required.
- » Training should be delivered by qualified trainers.
- » Each employee should have their training documentation. This also includes information technology (IT) professionals and software engineers.
- » Training should be an ongoing effort.
- » Regular quality audits should include training to verify that training programs and procedures for training are followed.

Therefore, it is the laboratory management's obligation to provide internal and external training and an evaluation of the effectiveness of training actions [1, 3].

In principal, there are 3 types of situations in which qualification is needed:

1. New personnel

When recruiting new people, it is very important that the person has the right knowledge and technical qualification for the specific job, as well as the right personality to fit into the laboratory's environment. Also, the evidence of good teamwork and communication skills is of utmost importance [1]. Before recruiting new employees, a description of the needed qualification and education for this post, based on the job description, should be established.

After the new staff member has entered the organization, according to Official Medicines Control Laboratories (OMCL) network [4], a basic educational plan should be written, including: definition of the targets of the training; time schedule; clear definition of the conditions for successfully completing the training; responsible person for every part of the training, and responsible person for the approval of every particular part of the training and the whole training program. Successfully completing the training can be achieved, either by passing an exam, performing tests under surveillance of a senior analyst, or performing internal PTS.

2. Laboratory staff that change or enlarge duties

In this case the personnel should be treated like new personnel, with the difference that only specific parts of the training have to be successfully completed.

3. Maintaining the qualification of personnel

The laboratory should have a procedure which defines the need for re-qualification and the minimal intervals depending on the complexity of the individual technique to keep the particular staff member qualified [4].

MONITORING PROGRESS AND PROVIDING FEEDBACK

The job should be accurately described and tasks and responsibilities should be well understood and accepted by all personnel (this holds for both, new and senior personnel). The person's development process in the job and the extent to which the previously specified objectives have been met should be monitored. Instant and regular feedback

should be given to employees on how they are doing and how they could improve their performance. Continuous good work should be rewarded [1].

TRAINING

The company's most valuable asset is a well-trained personnel. Proper training not only builds skills as required for the job, but also builds confidence. Initial and ongoing training should be given on analysis techniques; equipment; methods and procedures; regulations and quality standards; environmental, health and safety; teamwork; improving communication and improving creativity. Each training activity should be documented with content, dates and location. For all trainings, certificates on the successful participation should be available and signed by the instructor [1].

PLANNING, REVIEWING AND DOCUMENTING QUALIFICATION ACTIVITIES

All qualification activities have to be planned and reviewed periodically [4]. According to ISO/IEC 17025 and GLP the laboratory should maintain records of the relevant authorization(s), competence, educational and professional qualifications, training, skills and experience of all technical personnel. This information should be readily available and should include the date on which authorization and/or competence has been confirmed [2, 3].

REFERENCES

1. Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Informa Healthcare, Inc. New York, USA, pp 189-208, 2007
2. WHO Good practices for pharmaceutical quality control laboratories, Working document QAS/09.296, 2009
3. ISO/IEC 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, Geneva, Switzerland, 2005
4. Qualification and re-qualification of analysts, PA/PH/OMCL (11) 84, OMCL draft recommendation document, 2011

КВАЛИФИКАЦИЈА И РЕ-КВАЛИФИКАЦИЈА НА АНАЛИТИЧАРИТЕ

J. Тониќ Рибарска, Л. Угринова, К. Брезовска, Ј. Ацевска, А. Поцева Пановска, С. Трајковиќ
Јолевска, А. Димитровска

Центар за испитување и контрола на лекови, Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, Р. Македонија

Вработувањето, обуката и менаџирањето на квалификуван персонал е еден од највлијателните фактори за да се добијат точни и сигурни податоци. Доколку персоналот не е соодветно квалификуван и мотивиран за да се справи со сите лабораториски активности, и покрај целата документација и специфичната опрема која е на располагање во лабораторијата, нема да се добиваат континуирано добри аналитички податоци [1].

РЕГУЛАТИВИ, СТАНДАРДИ ЗА КВАЛИТЕТ И ВОДИЧИ

Поради големата важност на човечкиот фактор, сите стандарди за квалитет и регулативи за добра лабораториска пракса (ДЛП) содржат поглавја за квалификација на вработените и нивна обука.

Според ДЛП, „во секоја лабораторија мора да има доволно персонал со неопходно образование, тренинг, технички познавања и искуство за задачите што му се доделени и позицијата на која што се наоѓа. Персоналот не смее да биде вмешан во никакви конфликти на интереси и да биде под притисоци кои би влијаеле на квалитетот на резултатите“ [2].

Според ISO/IEC 17025 (поглавје 5.2), „раководниот тим на лабораторијата треба да биде сигурен во способноста на секој вработен кој што работи со одредена опрема, изведува анализи и/или калибрации, евалуира резултати и потпишува резултат од анализа и/или сертификати за калибрација. Персоналот кој што изведува одредени задачи мора да биде квалификуван врз основа на соодветно образование, обука, искуство и покажани вештини, според она што е пропишано во барањето“ [3].

Општо прифатени регулаторни барања и препораки:

- » персоналот треба да биде квалификуван за работа (образование, искуство, обука). Обуката треба да овозможи извршување на поставените задачи;
- » обуката има задолжителен карактер кој се однесува на секој вработен;
- » обуката треба да ги покрива оперативните задачи, ДЛП и системот за квалитет;
- » програмата за обука во која било организација, треба да биде опишана во политиката за квалитет, мастер планот или пак во планот за квалитет;
- » треба да има процедура за тоа како треба да се обучат вработените и обезбедувањето на квалитет треба да потврди дека се постапува според пропишаните процедури;
- » потребна е проценка за ефикасноста на обуката;
- » обуката треба да ја спроведат квалификувани тренери;
- » обуката треба да биде документирана за секој вработен. Ова би ги вклучило и професионалците по информациска технологија и софтверските инженери;
- » обуката треба да биде континуирана;
- » обуката треба да е вклучена во редовните проверки на системот за квалитет, со цел да се потврди дека програмите и процедурите за обука доследно се извршуваат.

Според тоа, раководниот тим има обврска да спроведе внатрешни и надворешни обуки и евалуација на ефективност од спроведената обука [1,3].

Во принцип, има три ситуации во кои е неопходна квалификација:

1. Нов персонал

Кога се вработуваат нови луѓе, многу е важно секој од нив да го има соодветното знаење и техничка квалификација за конкретната работа, како и соодветно да се вклопи во работната средина. Исто така, способноста за тимска работа и комуникациски вештини се од голема важност [1]. Пред вработување на нови лица, треба да се воспостави процедура за потребните квалификации и образование за соодветното работно место, врз основа на работните задачи, како и план за спроведување на обука. Успешното завршување на обуката може да се заклучи или со полагање на испит, изведување на анализи под надзор на постар аналитичар или пак со интерни споредбени тестови[4].

2. Лабораториски персонал кој што ги менува или зголемува своите должности. Во овој случај, на персоналот треба да се гледа како на нов персонал, со една мала разлика; само одредени делови од обуката треба успешно да се завршат.

3. Одржување на квалификацијата на персоналот.

Лабораторијата треба да има процедура која би ги дефинирала потребите за повторна квалификација и периодот на изведување,

зависно од сложеноста на индивидуалната техника, со цел да се одржи персоналот квалификуван [4].

СЛЕДЕЊЕ НА НАПРЕДОКОТ НА ПЕРСОНАЛОТ И ОБЕЗБЕДУВАЊЕ НА ПОВРАТНИ ИНФОРМАЦИИ

Работата треба точно да се опише и задачите и одговорностите треба добро да ги разбере и прифати целокупниот персонал (ова важи и за новиот и за постариот персонал). Треба да се следи развојниот процес на секој вработен и во работата и во однос на границите до кои претходно определените цели се исполниле. На вработените треба да им се даваат брзи и редовни повратни информации за тоа како ги исполнуваат поставените задачи, како би можеле да го подобрат своите перформанси. Континуираната успешна работа треба да се награди [1].

ОБУКА

Највредното нешто на една компанија е добро обучениот персонал. Соодветната обука не само што ги изградува вештините потребни за една работа, туку гради и самодоверба. Првичната и континуираната обука треба да бидат посветени на техниките за анализа, опремата, методите и процедурите, регулативите и стандардите за квалитет, стандардите за заштита на околината и здравјето, безбедноста, тимската работа, подобрувањето на комуникацијата и креативноста. Секоја активност во рамките на обуката треба да се документира со содржина, датум и локација. За секоја обука, треба да се обезбедат сертификати за успешно учество за оние кои биле дел од неа, потпишани од страна на инструкторот [1].

ПЛАНИРАЊЕ, РЕВИДИРАЊЕ И ДОКУМЕНТИРАЊЕ НА КВАЛИФИКАЦИОНИТЕ АКТИВНОСТИ

Сите квалификациски активности треба да се испланираат и ревидираат периодично [4]. Според ISO/IEC 17025 и ДЛП, лабораторијата треба да има евиденција на релевантните овластувања, надлежности, образовни и професионални квалификации, обука, вештини и искуство на целиот технички персонал. Овие информации треба да бидат лесно достапни и да го носат датумот на кој овластувањето и/или надлежноста е потврдена [2, 3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Informa Healthcare, Inc. New York, USA, pp 189-208, 2007
2. WHO Good practices for pharmaceutical quality control laboratories, Working document QAS/09.296, 2009
3. ISO/IEC 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, Geneva, Switzerland, 2005
4. Qualification and re-qualification of analysts, PA/PH/OMCL (11) 84, OMCL draft recommendation document, 2011

MANAGEMENT OF PROFICIENCY TESTING SCHEME (PTS)

J. Acevska, L. Ugrinova, K. Brezovska, A. Poceva Panovska, J. Tonic Ribarska, S. Trajkovic Jolevska, A. Dimitrovska

Center for drug quality control, Faculty of Pharmacy, University Ss. Cyril and Methodius, Skopje, Macedonia

INTRODUCTION

In the introduction chapter of the ISO/IEC 17043 [1] it is stated: "Interlaboratory comparisons are widely used for a number of purposes (...). Typical purposes for interlaboratory comparisons include:

- » Evaluation of the performance of laboratories for specific tests or measurements and monitoring laboratories' continuing performance;
- » Identification of problems in laboratories and initiation of actions for improvement which, for example, may be related to inadequate test or measurement procedures, effectiveness of staff training and supervision, or calibration of equipment;
- » Provision of additional confidence to laboratory customers;
- » (...)"

Interlaboratory studies are primarily performed for one of three reasons [2]: validation of a measurement method (method performance studies), validation of a reference materials (material certification studies) or assessing laboratory performance (proficiency studies).

Proficiency testing shares two key objectives: the provision of regular, objective, and independent assessments of the accuracy (which involves trueness and precision) of analytical laboratory results on routine test samples, as well as the promotion of improvements in the quality (accuracy) of routine analytical data.

Successful participation in proficiency testing schemes proves that the entire analytical quality process is working well [3]. This holds true for the analytical method, the equipment hardware and software, reference materials, and people.

Bodies assessing the technical competence of testing laboratories, such as accreditation and certification bodies, use the results of proficiency testing in their assessment. ISO/IEC Guide 43 Part 1 [4] has recommendations on the development and operation of proficiency testing. The second part covers guidance for selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies [5].

However, results from proficiency testing schemes are only one of the mechanisms which contribute to the establishment of mutual confidence between users of the participating laboratories' services.

PROCEDURE

The proficiency testing process should follow a protocol that has been developed by a collaboration of scientists from many countries under the joint organization of ISO, IUPAC, and AOAC International [6]. In a typical proficiency testing scheme, portions of a well-characterized test material are distributed by the organizer, on a regular basis, to participating laboratories for analysis. The laboratories analyze the samples using methods and standards usually applied for that sample and send the results back to the organization that distributed the test material. Each laboratory's result is then compared to the true (assigned) value for the test material concerned.

There are five methods for obtaining the assigned value, a working estimate of the true value [7]:

- » Use of a theoretical value confirmed in the feasibility study.
- » The addition of a known amount or concentration of the analyte to a base material containing none of the analyte (s).
- » Use of official Assay Chemical Reference Substances or Biological Reference Preparations from the Ph. Eur. or WHO.
- » Use of a consensus value produced by a group of experts or referee laboratories.
- » Use of a consensus value based on the results of the participants.

Robust statistics are applied for evaluation of the PTS results. One of the goals of the procedure is to find a way to convert the data of the laboratories into scores that are easy to understand and of universal applicability. Each result (x) is converted into a "Z" score that describes the previously specified acceptable variability between laboratories and is related to the ruggedness of the analysis method. Z scores between $\pm 2s$ will occur in 95 percent of all cases and are regarded as satisfactory. Z scores between 2 and 3 are considered to be questionable and will occur in 5 percent of all cases, but those outside the range of $\pm 3s$ are considered unsatisfactory. Results are plotted to visualize them as easily as possible and are sent to each laboratory.

Depending on the degree of agreement with the assigned value, the laboratories are scored and receive a report that enables them to review how well they have performed in the test. The results are confidential to the laboratory and the organizer, but clients of the laboratory and the accreditation body may request the test results. Typically, calibration standards are not sent with the sample, and the analytical methods are not mandated. However, laboratories are advised to report the method because this may be used to obtain information if the method itself is a source of the deviation from the true results.

ADVANTAGES FOR LABORATORIES

Participating in proficiency testing schemes can be quite expensive; but the advantages for a laboratory are quite numerous:

- » External and independent assessment of data quality for specific tests.
- » A means of demonstrating the data quality to customers, accreditation bodies, and regulatory agencies.
- » A motivation to improve analytical quality.
- » Information on the performance characteristics of analytical methods and the quality of reference materials.
- » A laboratory experiencing difficulty with a particular analysis can often seek advice from the scheme organizer to improve its processes.
- » Investigations can result in improved methods being introduced and, therefore, produce more accurate data.
- » Compliance with accreditation standards.

REFERENCES

- [1] ISO/IEC 17043 (2010) Conformity assessment – general requirements for proficiency testing, International Organization for Standardization, Geneva
- [2] M Reichenbacher, J.W. Einax: Challenges in Analytical Quality Assurance, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011, (ISBN 978-3-642-16594-8 e-ISBN 978-3-642-16595-5)
- [3] H.Ludwig, Validation and qualification in analytical laboratories, 2nd ed. (2007) Informa Healthcare USA, Inc., New York (ISBN-13: 978-0-8493-8267-3)
- [4] ISO. Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons - Part 1: Development and Operation of Proficiency Testing Schemes. Geneva Switzerland. 1997. Guide 43-1.
- [5] ISO IEC: Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons – Part 2: Selection and Use of Proficiency Testing Schemes by Laboratory Accreditation Bodies. Geneva Switzerland. 1997. Guide 43-2.
- [6] Thompson M., Ellison S. and Wood R., International harmonized protocol for proficiency testing of chemical analytical laboratories, Pure Appl. Chem 2006., 78 (1):145–196 at <http://www.iupac.org/publications/pac/2006/pdf/7801x0145.pdf>.
- [7] EDQM Instruction IS7/06, Rev 02 (31/01/2011) Management of Proficiency Testing Scheme (PTS)

УПРАВУВАЊЕ СО ТЕСТОВИТЕ \ ЗА МЕГУЛАБОРАТОРИСКА СПОРЕДБА

Ј. Ацевска, Л. Угринова, К. Брезовска, А. Поцева Пановска, Ј. Тониќ Рибарска, С. Трајковиќ Јолевска, А. Димитровска

Центар за испитување и контрола на лекови, Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, Р.Македонија

ВОВЕД

Во воведниот дел на ISO/IEC 17043 [1] е цитирано:

“Меѓулабораториските споредби вообичаено, се наменети за:

- » Евалуација на перформансите на лабораториите за специфични испитувања или мерења, како и следење на континуираната компетентност на лабораториите;
- » Идентификација на лабораториските проблеми и отпочнување на мерки за подобрување, што на пример, може да се поврзани со: несоодветна процедура за испитување или мерење, ефективност на обуката на персоналот и спроведувањето на надзорот, или калибрација на опремата;
- » Обезбедување на дополнителна доверба на корисниците на услугите на лабораторијата;
- » (...).”

Тестовите за меѓулабораториска споредба првенствено се спроведуваат поради една од трите причини [2]: валидација на методот (студии за проценка на перформансите на методот), валидација на референтни материјали (студии за сертифицирање на референтен материјал) или проценка на перформансите на лабораторијата (студии за проценка на вештини).

Проценката на лабораториските вештини за спроведување на испитувањата има две клучни цели: обезбедување на редовни, објективни и независни проценки на веродостојноста (која вклучува точност и прецизност) на аналитичките резултати за рутински примероци, како и промоција на подобрување на квалитетот на аналитичките податоци.

Успешното учество во студиите за проценка на вештина докажува дека воспоставениот систем за квалитет функционира добро [3].

Акредитационите и сертификационите тела што вршат проценка на техничката компетентност на лабораториите за испитување, во рамките на нивната оценка, ги користат резултатите добиени од студиите за проценка на вештина [4].

Резултатите од спроведените студии за проценка на вештина претставуваат само еден од механизмите за создавање на доверба кај корисниците на услугите на лабораторијата.

ПОСТАПКА

Студиите за проценка на вештина се спроведуваат според протокол што е развиен како резултат на соработка меѓу експертите од повеќе земји под заедничка организација на ISO, IUPAC и AOAC [5]. Во рамки на една вообичаена студија за проценка на вештина, организаторот дистрибуира добро дефиниран примерок за испитување до лабораториите-учеснички. Лабораториите ги анализираат примероците користејќи методи и стандарди што се применуваат за тој примерок и ги испраќаат резултатите на организаторот. Секој резултат добиен од различните лаборатории се споредува со вистинската вредност за испитуваната карактеристика на примерокот. Постојат пет методи за определување на вистинската вредност на

испитуваната карактеристика на примерокот [6]:

- » Употреба на теоретската вредност потврдена со студија на физибилност.
- » Додавање на позната количина или концентрација на аналитите во основниот примерок што не содржи ниту еден од испитуваните аналити.
- » Примена на хемиски референтни супстанции или биолошки референтни препарати од Европската фармакопеја или Светската здравствена организација.
- » Употреба на консензуална вредност добиена од страна на група на експерти или референтни лаборатории.
- » Употреба на консензуална вредност добиена врз основа на резултатите од учесниците.

За оценување на резултатите добиени од студиите за проценка на вештина се применува робустна статистика, со цел претворање на добиените податоците од лабораториите во резултати што се лесно разбирливи и применливи. Секој резултат (x) се претвора во "Z" вредност што ја опишува претходно дефинираната прифатлива варијабилност помеѓу лабораториите. Z вредности што се наоѓаат помеѓу две стандардни девијации се сметаат за задоволителни (95% од случаите). Z вредности меѓу две и три стандардни девијации се сметаат за сомнителни и се јавуваат кај 5% од сите случаите. Но, само оние резултати надвор од подрачјето на три стандардни девијации се сметаат за незадоволителни. Резултатите се претставуваат графички и се испраќаат до секоја лабораторија-учесничка. Во зависност од степенот на совпаѓење со вистинската вредност, лабораториите добиваат извештај што овозможува проценка на квалитетот на спроведување на студијата. Резултатите се доверливи за лабораторијата и организаторот, но по потреба може се достапни и за корисниците на услугите од лабораторијата и за акредитационото тело.

ПРЕДНОСТИ ЗА ЛАБОРАТОРИИ

Учеството во студиите за проценка на вештина носи бројни предности за лабораторијата:

- » Надворешна и независна оценка на квалитетот на податоците за специфични методи.
- » Начин на демонстрирање на квалитетот на податоците од лабораториските испитувања на корисниците на услугите, акредитационите тела и регулаторните органи.
- » Подобрување на системот за квалитет.
- » Информации за карактеристиките на аналитичките методи и квалитетот на референтните материјали.
- » Преиспитувањето може да резултира со подобрување на воведените методи, а со тоа и точноста на добиените податоци.
- » Усогласеност со стандардите за акредитација.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] ISO/IEC 17043 (2010) Conformity assessment – general requirements for proficiency testing, International Organization for Standardization, Geneva
- [2] M Reichenbacher, J.W. Einax: Challenges in Analytical Quality Assurance, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011, (ISBN 978-3-642-16594-8 e-ISBN 978-3-642-16595-5)
- [3] H.Ludwig, Validation and qualification in analytical laboratories, 2nd ed. (2007) Informa Healthcare USA, Inc., New York (ISBN-13: 978-0-8493-8267-3)
- [4] ISO. Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons - Part 1 Development and Operation of Proficiency Testing Schemes. Geneva Switzerland. 1997. Guide 43-1 & Part 2: Selection and Use of Proficiency Testing Schemes by Laboratory Accreditation Bodies. Geneva Switzerland. 1997. Guide 43-2.
- [5] Thompson M., Ellison S. and Wood R., International harmonized protocol for proficiency testing of chemical analytical laboratories, Pure Appl. Chem 2006., 78 (1):145–196 at <http://www.iupac.org/publications/pac/2006/pdf/7801x0145.pdf>.
- [6] EDQM Instruction IS7/06, Rev 02 (31/01/2011) Management of Proficiency Testing Scheme (PTS)



**ФАРМАЦЕВТСКИ АНАЛИЗИ /
ОБЕЗБЕДУВАЊЕ КВАЛИТЕТ /
РЕГУЛАТИВА**

постер презентации

**PHARMACEUTICAL ANALYSIS /
QUALITY ASSURANCE /
REGULATORY AFFAIRS**

poster presentations

AN RP-HPLC STUDY FOR THE PKA DETERMINATION OF RIZATRIPTAN AND ITS IMPURITIES

Biljana Otašević, Mira Zečević, Zorica Vujić and Vesna Kuntić

Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Vojvode Stepe 450, Serbia

INTRODUCTION

Rizatriptan (*N,N*-dimethyl-2-[5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1*H*-indol-3-yl]ethanamine), (Fig. 1a) is a recently developed antimigraine drug used for the treatment of migraines and severe headaches. It is a selective serotonin 5-HT_{1B/1D} receptor agonist who blocks the stimulated secretion of neuropeptides from trigeminal nerves and breaks the nociceptive cycle of migraine. The degradation products of rizatriptan are L-747.019 (Fig. 1b) formed by N-oxidation in the presence of air and L-783.540 (Fig. 1c) formed in the interaction of the drug with the sweetener in the formulation (transferring the methyl group from aspartame to the aliphatic tertiary nitrogen in the rizatriptan molecule).

OBJECTIVES

The goal of this investigation was to determine the dissociation constants (pK_a) of rizatriptan and its impurities by the HPLC assay. pK_a of rizatriptan had been already investigated by classical methods like potentiometry and UV-Vis spectroscopy, but there is no literature data for pK_a of its impurities (1,2).

EXPERIMENTAL

The standard substances of rizatriptan benzoate, L-747.019 and L-783.540, were obtained from Merck. Chromatographic analyses were performed on an HP 1200

(Agilent, Palo Alto, CA, USA) chromatographic system equipped with on-line degasser, binary pump, column oven and photo diode array detector. Sample injection was made through Rheodyne injector valve with a 20 μL sample loop. The method used C₁₈ XTerra (5 μm, 150 mm x 3.9 mm) column (Waters, MA, USA). After being loaded onto the column, the samples eluted at a temperature of 20°C at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ with the mobile phase consisting of a mixture of 1% TEA and methanol (10:90 v/v) while pH of the water phase was

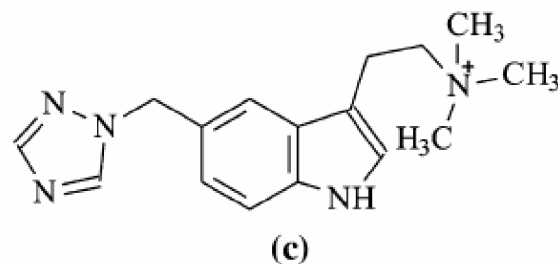


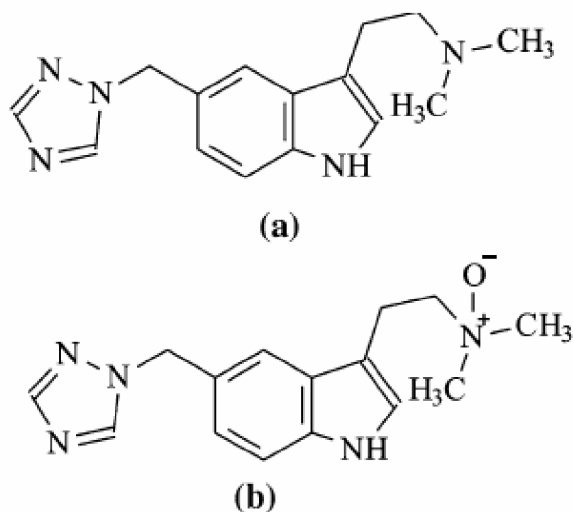
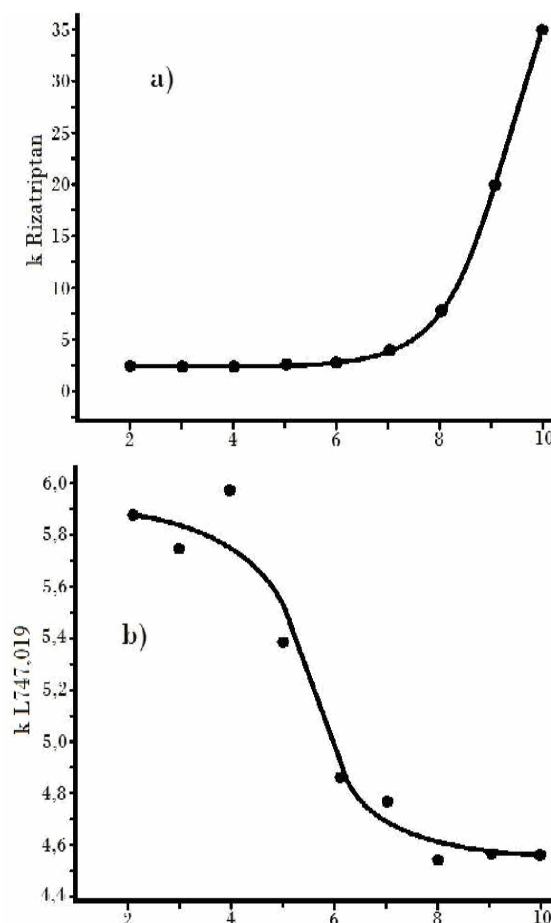
Fig 1. The structure of rizatriptan and its impurities adjusted from 2 to 10 with orthophosphoric acid. The detection was performed at 225 nm. Solutions for the determination of dissociation constants were prepared in water in concentration of 5 μg mL⁻¹.

RESULTS AND DISCUSSION

Plots of the retention factor versus pH are presented in Fig. 2 for rizatriptan a) and its impurities b) and c). Typical sigmoidal curves were obtained for mobile phase of 10% MeOH. The observed retention factors versus pH of the mobile phases were fitted to the equation (Boltzman sigmoid $Y = \text{bottom} + (\text{top} - \text{bottom}) / [1 + \exp(V50 - X) / \text{slope}]$), using a non-linear least square program (Origin 7.0) (3). Computer generated plots k versus pH were obtained and the pH value at the inflection point (V50) was taken as valuable index of apparent pK_a. Using polykatic method (plot of apparent pK_a versus percentage of methanol) the real pK_a values were obtained: for rizatriptan: pK_a=9.477, for impurity L-747.019: pK_a=6.298 and for impurity L-783.540 pK_a= 6.157.

CONCLUSION

The proposed method enable accurate determination of pK_a values, since the obtained value for rizatriptan is in agreement with literature data.



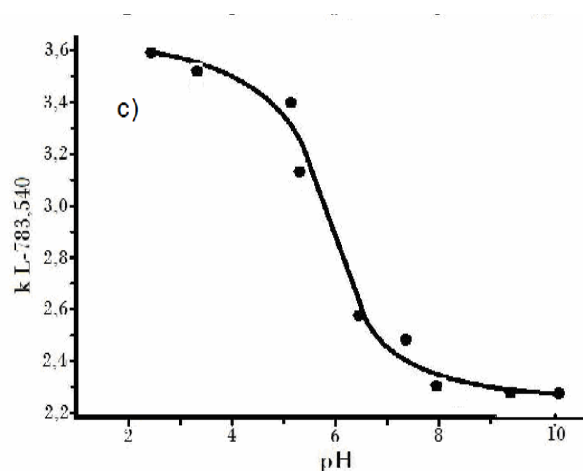


Fig. 2. Plots of the retention factor of risatriptan and its impurities versus pH

REFERENCES

1. Zecevic M, Jovic B, Zivanovic Lj, Protic A, *Chromatographia*, 2008, 68, 911–918
2. Jovic B, Zecevic M, Zivanovic L, Licanski A, *Anal Lett*, 2007, 40, 2301–2316
3. Bartolini M, Bertucci C, Gotti R, Tumiatto V, Cavalli A, Recanatini M, Andrisano V, *J Chromatogr A*, 2002, 958, 59–67

SOLID-PHASE EXTRACTION OF IBUPROFEN FROM PHARMACEUTICAL CREAM

Slavica Sunaric, Milica Petkovic and Marko Denic

Faculty of Medicine, Department of Chemistry,
Bulevar Zorana Djindjica 81, Nis, Serbia

In many new commercial preparations ibuprofen is mixed with other active substances or excipients that facilitate its absorption. These substances may interfere with the determination of ibuprofen by UV spectrophotometry. In cream, the active substance is dispersed in complex emulsion containing hydrophobic and hydrophilic compounds, emulsifying agents and preservatives. Solid phase extraction is widely used tools for sample cleanup, but in the analysis of drugs from pharmaceuticals is rarely used. The aim of this study was investigation of ibuprofen extraction on three different SPE sorbents. The appropriate SPE conditions (sorbent, pH, adsorption, washing, and elution) were investigated using UV spectrophotometry and ibuprofen absorption at 264nm. The performance of the developed SPE method was first evaluated on standard ibuprofen solutions and then the suitability of the method was checked on solutions of commercial pharmaceutical cream samples.

Optimal solid phase extraction conditions and recovery were tested on three different sorbents: OASIS® MAX, 1 cc, Waters Corporation, Milford, Mass., USA, OASIS® HLB, 1 cc, Waters Corporation, Milford, Mass., USA and Chromabond® C18ec, 1ml/100mg, Macherey-Nagel, GmbH, Düren, Germany. Methods optimization has been done with the standard methanol ibuprofen solution concentration of 0.5 mg/ml. Since ibuprofen is a weak acid (pKa 5.2) at low pH values will be in the neutral form, while at higher pH values ionized form will be dominant. In order to investigate the retention of ibuprofen on hydrophilic-lipophilic sorbent (HLB), octadecyl-modified silica (C18) and strong

anion exchanger (MAX), pH of the ibuprofen solutions was varied in the range from 3.0 to 10.0.

Before use, the SPE columns were conditioned and equilibrated with 2ml methanol and 3ml deionized water. Solutions of ibuprofen, which are passed through HLB and C18 columns are adjusted by acetic acid to pH 3.0. For extraction on MAX cartridges pH of the ibuprofen solution is set to 10.0 with 2% ammonium hydroxide. After sample loading, the sorbents were washed with 2% CH₃COOH (HLB and C18ec) and 2% NH₄OH (MAX). For elution of ibuprofen from HLB and C18 cartridges methanol was used, while elution from MAX sorbent was performed with mixture of MeOH:2%CH₃COOH (2:1,v/v). After extraction ibuprofen was determined by UV spectrophotometry using calibration curve at 264nm.

Adequate retention was observed for ibuprofen on all three SPE sorbents. At low pH ibuprofen was more strongly retained under reversed-phase condition, so the recovery values were higher on HLB and C18ec sorbents. In contrast, at high pH ibuprofen was strongly retained on strong anion-exchange MAX sorbent. Yield of standard ibuprofen extraction has very good value for the MAX cartridge (recovery 98%). For HLB and C18ec sorbents these values were 88% and 105% respectively. For all three used cartridges relative standard deviations were up to 3%.

Commercial pharmaceutical ibuprofen cream (Brufen®-Galenika) was dissolved in methanol, homogenized by stirring and filtered. Further sample preparation and extraction procedure were the same as for the standard ibuprofen solutions. The best extraction yield was obtained on the MAX cartridge 99.2%. For HLB and C18 sorbents recovery values were much higher, which indicates retention and interferences some lipophilic compounds from pharmaceutical cream. The obtained results show that ibuprofen could be successfully separated and determined UV spectrophotometrically using the proposed extraction procedure for MAX Oasis cartridge.

REFERENCES

1. British Pharmacopoeia, electronic version 11.0., The Stationery Office on behalf of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA), Crown Copyright 2006.
2. D. Watson, *Pharmaceutical Analysis*, Edinburgh, Elsevier, 2005.

DETERMINATION OF DOXYCYCLINE IN PHARMACEUTICAL SAMPLES BY HPLC WITH UV DETECTION

Slavica Sunaric¹, Sandra Stojanovic², Snezana Mitic³

¹Faculty of Medicine, Department of Chemistry, Bulevar dr Zorana Djindjica 81, 18000 Nis, Serbia, ²Beiersdorf d.o.o.Beograd, Omladinskih brigada 88a, 11070 Novi Beograd, Serbia, ³Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Department of Chemistry, Visegradska 33/224, 18000 Nis, Serbia

Doxycycline is a broad spectrum antibiotic against gram-positive and gram-negative bacteria and non-typical microorganisms. Favourable antimicrobial properties, as well as absence of great number of side effects led to its wide application in therapy of both human and animal infections. The solid dosage forms available on our market contain doxycycline in the form of monohydrate and hyclate.

Determination of active substances in pharmaceutical preparations is an integral part of quality control of drugs. The aim of this paper was the modification of the existing pharmacopoeia's HPLC method for determination of doxycycline. For such a purpose, it was necessary to investigate the influence of various parameters and determine optimal chromatographic conditions. Mobile phase has been inserted isocratically. The composition of mobile phase was partially changed in comparison to the procedure given in Ph. Jug V. The mobile phase consisted of 2-methyl-2-propanol (80g), 35 g/L K_2HPO_4 adjusted to pH 9.0, 10 g/L triethylammonium-acetate adjusted to pH 9.0 and 40 g/L Na-EDTA adjusted to pH 9.0. Measured pH of mobile phase was 8.5. ODS silica gel C18 analytical column was used instead of the styrene-divinylbenzene copolymer. Satisfactory separation of doxycycline from the mixture with excipients and filling agents was achieved on the reversed-phase Zorbax Extend C18 analytical column (4.6x250 mm, 5 μ m particle size) at 40°C with flow-rate of 1.0 mL/min and the injected volume of 30 μ l. A UV/VIS detector set at 254 nm, 275 nm and 375 nm was used to monitor the effluent.

For calibration curve, a series of standard solutions of doxycycline was prepared in the interval of concentrations from 1.85-12.94 μ g/mL. Chromatograms of standard solutions at three above-mentioned wavelengths were recorded. Calibration curves at 3 wavelengths were linear with correlation coefficients of 0.999. The limits of detection and quantification were from 0.24-0.25 μ g/mL for LOD and 0.80-0.83 μ g/mL for LOQ. Calibration curve at 275 nm has been the most suitable for quantitative analysis of doxycycline from solid dosage forms due to its largest slope. Retention time at which the peak of doxycycline appears is short (4.45 min), enabling fast and efficient chromatographic analysis.

After validation, the method was applied for determination of doxycycline-hydrate and doxycycline-monohydrate in commercial solid preparations Doksiciklin[®], Dovicin[®] and Vibramycin[®]. Proposed HPLC method may be applied for determination of doxycycline in pharmaceutical preparations with satisfactory accuracy and precision. Mean recoveries were 101.1%, 96.6% and 91.4% for Doksiciklin[®], Dovicin[®] and Vibramycin[®]. The relative standard deviation was lower than 1.5% for the most of samples. Each analysis required no longer than 5.0 min. Results obtained by the proposed method, were compared to those by the reference HPLC method that is described in Ph.Jug V and satisfactory agreement was achieved.

REFERENCES

1. Ph.Jug V, Savremena administracija, Beograd, 2000.
2. D. Watson, Pharmaceutical Analysis, Edinburgh, Elsevier, 2005.
3. Delgado JN, Remers WA. Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry. New York: Lippincott-Raven Publishers, 1998.

DETERMINATION OF KETOCONAZOLE IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS

Biljana Gjorgjeska

Faculty of Medical Sciences, University "Goce Delcev"-Stip

INTRODUCTION

Ketoconazole is used to treat fungal infections. Ketoconazole is most often used to treat fungal infections that can spread to different parts of the body through the bloodstream such as yeast infections of the mouth, skin, urinary tract, and blood, and certain fungal infections that begin on the skin or in the lungs and can spread through the body. Ketoconazole is also used to treat fungal infections of the skin or nails that cannot be treated with other medications. Ketoconazole is in a class of antifungals called imidazoles. It works by slowing the growth of fungi that cause infection. Branded as Nizoral[®] ketoconazole is formulated as tablets, cream and over-the-counter ketoconazole shampoo.

OBJECTIVES

The aim of this research was to study and to standardize an ultraviolet spectrophotometric (UVS) method, potentiometric and a high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the determination of ketoconazole in commercially available pharmaceutical preparations (tablets and creams). These three methods were compared and discussed with respect to their sensitivity and ready-applicability in routine analytical work.

METHODS

Absorption spectra and spectrophotometric determination were carried out on a UVS spectrophotometer, in 1 cm cuvettes. The concentration of ketoconazole stock solutions was 10^{-4} mol \cdot dm $^{-3}$ in 0.1 mol \cdot dm $^{-3}$ HCl. Solutions in range of investigated concentrations were obtained by diluting of stock in range from 0.003 to 0.02 mg \cdot dm $^{-3}$. The absorbance was measured at 224 nm. Potentiometric titrations were made using glass and saturated (KCl) calomel electrode. The determined ketoconazole is dissolved in acetic acid. A solution of HClO $_4$ (0.1 mol \cdot dm $^{-3}$) in acetic acid was used for titrations. Each cm 3 of HClO $_4$ (0.1 mol \cdot dm $^{-3}$) is equivalent to 0.02657 g of ketoconazole. HPLC analysis of ketoconazole, in the presence of econazole as internal standard, was performed using Ultrapac LiChrosorb RP 18 (5 μ m) column, with the mobile phase consisting of 0.2% diethylamin in methanole/0.5% ammonium acetate solution (78:22); flow rate = 0.9 cm 3 /min and UV detection at 224 nm.

RESULTS

From the obtained results it can be seen that the differences in assay values in all methods are not statistically significant.

CONCLUSIONS

The described methods for quantitative determination of ketoconazole in pharmaceutical preparations are simple and accurate. They can be performed directly without removing the ingredients. The spectrophotometric method is recommended for quantitative determination in routine analysis. It is not only satisfactorily reproducible, but also selective with respect to the ingredients. Although, the potentiometric method cannot be considered as selective, it is rapid and reproducible enough to be used as an alternative routine method. The HPLC method is useful especially for determination of impurities and

degradation products in stability studies.

REFERENCES

1. European Pharmacopoeia (2008) 6th Ed., European Pharmacopoeia Commission
2. The United States Pharmacopoeia 33th NF 29 (2010), Ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention
3. Heyden, Y.V., A.N.M. Nguyet, M.R. Detaevnier, D.L. Massart & J.P. Vercammen (2002) 4. J. Chromatogr. A 958 p. 191-201
5. Arranz, P.; Arranz, A.; Moreda, J.M.; Cid, A.; Arranz, J.F. (2003) J. Pharm.Biom. Anal., New York, 33, p. 589-596
6. Inara Staub, Ana Maria Bergold (2004) Acta Farm. Bonaerense 23 (3) p.387-390
7. Y Vander Heyde, A Nguyen Minh Nguyet, M R Detaevnier, D L Massart, J Plaizier-Vercammen(2002) Journal of Chromatography A 958 (1-2), p. 191-201
7. El-Shabouri, S.R.; Emar, K.M.; Kashaba, P.Y.; Mohamed, A.M (1998) Anal. Lett, New York, 31, p. 1367-1385

ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КЕТОКОНАЗОЛ ВО ФАРМАЦЕВТСКИ ФОРМУЛАЦИИ

Биљана Ѓорѓеска

Факултет за медицински науки, Универзитет "Гоце Делчев"-Штип

ВОВЕД

Кетоконазол се користи во третман на габични инфекции. Кетоконазол најчесто се користат за лекување на габични инфекции кои можат да се шират на различни делови од телото преку крвотокот како што се габични инфекции на устата, кожата, на уринарниот тракт, и крв, и некои габични инфекции, кои започнуваат на кожата или на белите дробови и може да се прошири низ телото. Кетоконазол исто така се користи за лекување на габични инфекции на кожата и ноктите кои не можат да бидат третирани со други лекови. Кетоконазол е во класа на антифунгални лекови наречени имидазоли. Тој работи преку забавување на растот на габите кои предизвикуваат инфекции. Заштитен како Nizoral[®], кетоконазол доаѓа во форма на таблети, крем и како кетоконазол шампон.

ЦЕЛ

Целта на ова истражување е да се проучат и стандардизираат ултравиолетовата спектрофотометриска (УВС) постапка, потенциометриската и високо перформансната течна хроматографска (HPLC) метода за одредување на кетоконазол во комерцијално достапни фармацевтски препарати (кремови и таблети). Овие три методи се споредувани и дискутурана е нивната сензитивност и применливост за рутинска аналитичка работа.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Апсорционите спектри и спектрофотометриското определување беа снимени на УВС спектрофотометар, во кивети од 1 см. Концентрацијата на кетоконазол во основниот раствор беше $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ во $0,1 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^{-3}$. Во рамките на испитаните концентрации мерните раствори се добиени со разредување на основниот раствор во концентрации од $0,003\text{-}0,02 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Апсорпцијата беше измерена на 224 nm. Потенциометриските титрации беа работени со користење на стаклена и заситена (KCl) каломел електрода. Определуваниот кетоконазол се раствора во раствор на оцетна киселина. Раствор на HClO_4 ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) во оцетна киселина беше користен за титрациите. Секој cm^3 на HClO_4 ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) е еквивалентно на $0,02657 \text{ g}$ на кетоконазол. Направена беше HPLC анализа на кетоконазол, во присуство на еконазол како внатрешен

стандард, користена е Ultracrap LiChrosorb RP 18 ($5 \mu\text{m}$) колона, со мобилни фаза која се состои од $0,2\%$ диетиламин во метанол/ $0,5\%$ раствор на амониум ацетат (78:22); проток = $0,9 \text{ cm}^3/\text{min}$ и УВ детекција на 224 nm.

Резултати и дискусија

Од добиените резултати е видно дека разликите помеѓу добиените вредности во сите методи не се статистички значајни.

Заклучок

Опишаните методи за квантитативно определување на кетоконазол во фармацевтски препарати се едноставни и прецизни. Тие можат да се вршат директно, без отстранување на другите состојки. Спектрофотометрискиот метод се препорачува за квантитативно определување во рутинска анализа. Тој не е само задоволително репродукцибилен, туку и селективен во однос на состојките. Иако, потенциометрискиот метод не може да се смета како селективен, тој е брз и доволно репродукцибилен за да се користи како алтернативен рутински метод. HPLC методот е особено корисен за определување на нечистотии и деградациони продукти во студиите на стабилност.

РЕФЕРЕНЦИ

1. European Pharmacopoeia (2008) 6th Ed., European Pharmacopoeia Commission
2. The United States Pharmacopoeia 33th NF 29 (2010), Ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention
3. Heyden, Y.V., A.N.M. Nguyet, M.R. Detaevnier, D.L. Massart & J.P. Vercammen (2002) J. Chromatogr. A 958 p. 191-201
4. Arranz, P.; Arranz, A.; Moreda, J.M.; Cid, A.; Arranz, J.F. (2003) J. Pharm.Biom. Anal., New York, 33, p. 589-596
5. Inara Staub, Ana Maria Bergold (2004) Acta Farm. Bonaerense 23 (3) p.387-390
6. Y Vander Heyde, A Nguyen Minh Nguyet, M R Detaevnier, D L Massart, J Plaizier-Vercammen(2002) Journal of Chromatography A 958 (1-2), p. 191-201
7. El-Shabouri, S.R.; Emar, K.M.; Kashaba, P.Y.; Mohamed, A.M (1998) Anal. Lett, New York, 31, p. 1367-1385

VALIDATION AND QUANTIFICATION OF BACTERIAL ENDOTOXINS IN SOLUTIONS FOR HAEMODIALYSIS AMINAL-100B AND AMINAL-100K

Elizabeta Popovska¹, Hristina Babunovska¹,
Silvana Ilioska-Zlatanovic¹, Maja Simjanovska¹,
Biserka Simonovska²

¹ALKALOID A. D, Blvd. A. Makedonski 12, 1000 Skopje, R.Macedonia
²Dijagnostika Farmahem, St.4-th July No.2/3, 1000 Skopje, R.Macedonia

INTRODUCTION

The importance of endotoxin contamination in solutions for haemodialysis manufacturing becomes apparent when confronted with four aspects of its existence: its ubiquity in nature, potent toxicity, stability or ability to retain after being subjected to extreme conditions and relative likelihood of its occurrence in haemodialysis solutions.

OBJECTIVE

Validation of Bacterial endotoxins test for concentrated haemodialysis solutions AMINAL-100B and AMINAL-100K.

METHOD

For quantitative determination of bacterial endotoxins in concentrated haemodialysis solutions, Kinetic turbidimetric method PYROGENT- 5000 has been used, along with Microplate reader Elx808. The results are calculated and stored with WIN QCL 3.1 software. The Kinetic turbidimetric method is based on measuring the turbidity (optical density) of an LAL/sample mixture at regular interval throughout the test. The time required before the appearance of turbidity (Reaction time) is inversely proportional to the amount of endotoxin present.

Solutions for haemodialysis are solutions of electrolytes with a concentration close to the electrolytic composition of plasma. Because of the large volumes used, haemodialysis solutions are usually prepared by diluting a concentrated solution. pH problems are the most important biochemical cause of LAL-test inhibition. When dealing with acid or base solutions, correction of pH should be made in optimum rang 6-8. AMINAL-100B has pH 8,3 and correction should be made with LRW dilution. AMINAL-100K has acid pH 2,3 and correction should be made with 0,1 N NaOH .

Concentrated haemodialysis solutions firstly should be diluted: AMINAL-100B (1,83: 36,83); AMINAL-100K(1:36,83) with water of suitable quality than pH correction should be made.

RESULTS

Validation has been made firstly with screening (Inhibition / Enhancement) test, upon received results the validation further was done on three series. For that purpose LONZA reagents have been used; lysate sensitivity $l = 0,01$ EU/ml; $MVD = ELC/l = 0,5 / 0,01 = 50$. Dilutions used for preliminary, Inhibition / Enhancement test are: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 and 1:50.

Concentrated haemodialysis solution AMINAL-100B is inhibitory up to 1/4 dilution inclusive. The inhibition was overcome at 1/8 dilution which gave PPC recovery 81%. Upon received results the validation further was done on three series of AMINAL-100B with dilution 1:10. The endotoxin concentration reported is less than 0,100 EU/ml.

Concentrated haemodialysis solution AMINAL-100K has low pH. This property makes it a powerful inhibitor of the LAL assay. pH adjustment has been made with 0,1N NaOH and the product was tested in dilutions up to MVD. Since the inhibition was overcome, validation further was done on three series of AMINAL-10KB with dilution 1 : 2. The endotoxin concentration reported is less than 0,020 EU/ml.

CONCLUSIONS

Validation of the Bacterial endotoxins test on Concentrated haemodialysis solutions AMINAL-100B and AMINAL-100K was successfully done.

1. The inhibition was overcome at Concentrated haemodialysis solution AMINAL-100B. Routine testing should be done with dilution 1:10.
2. The inhibition was overcome at Concentrated haemodialysis solution AMINAL-100K. Routine testing should be done with dilution 1:2, after pH adjusting.

REFERENCES

1. Ph. Eur. 7 (2.6.14) & Haemodialysis solutions;
2. LAL Times Vol.8, No1 MARCH 2001;
3. PYROGENIC REACTIONS DURING H/EMODIALYSIS CAUSED BY EXTRAMURAL ENDOTOXIN; The Lancet, Volume 306, Issue 7938
4. EDTNA/ERCA Guidelines: Technical Section; Quality assurance for dialysis-quality water and dialysis fluid
<http://www.edtnaerca.org/pdf/education/WTguidelinesmicrob.pdf>
5. FDA - Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Food and Drug Administration.
6. ENDOTOXINS, Kevin L. Williams

ВАЛИДАЦИЈА И ОДРЕДУВАЊЕ НА БАКТЕРИСКИ ЕНДОТОКСИНИ ВО РАСТВОРИ ЗА ХЕМОДИЈАЛИЗА AMINAL-100B И AMINAL-100K

Елизабета Поповска¹, Христина Бабуновска¹, Силвана Илиоска-Златановиќ¹, Маја Симјановска¹, Бисерка Симоновска²

¹АЛКАЛОИД А. Д, Бул. А. Македонски 12, 1000 Скопје, Македонија
²Дијагностика Фармакхем, Ул.4-ти Јули бр.2/3,1000 Скопје, Македонија

ВОВЕД

Важноста на контролата на контаминација со ендотоксини при производство на раствори за хемодијализа е очигледна кога ќе се соочиме со четирите аспекти на нивното постоење: нивното присуство во природата, изразената токсичност, стабилноста на ендотоксините по изложување на екстремни услови и веројатноста за нивно присуство во растворите за хемодијализа.

ЦЕЛ

Валидација на методолошка постапка за одредување на бактериски ендотоксини во концентрирани р-ри за хемодијализа AMINAL-100B и AMINAL-100K.

МЕТОДА

Бактериските ендотоксини во растворите за хемодијализа се одредувани со Кинетичко турбидиметриска метода, реагенси PYROGENT- 5000, со Microplate reader Elx808се кој користи WIN QCL 3.1 софтвер. Принципот на методата е мерење на турбидитетот (оптичката густина) на смесата LAL/мокра во одреден временски интервали. Времето потребно за појава на турбидитет (реакционо време) е обратно пропорционално со концентрацијата на бактериски ендотоксини.

Растворите за хемодијализа се раствори на електролити со концентрација слична на електролитниот состав на плазмата. Бидејќи се користат во голем волумен се подготвуваат со разредување на концентрираните раствори .

- » рН вредноста е критична точка за изведба на бактериски ендотоксин тест и затоа е неопходна негова корекција кај киселите и базните раствори за хемодијализа, во опсег 6-8 . Концентрираниот р-р за хемодијализа
- » AMINAL-100B има рН 8,3 и корекцијата се врши со дилуција со LRW. Концентрираниот р-р за хемодијализа AMINAL-100K има кисел рН 2,3 и корекцијата на рН се врши со 0,1 N NaOH.
- » Растворите прво се доведуваат до разредување кое се употребува за хемодијализа: AMINAL-100B(1,83 : 36,83); AMINAL-100K (1 :36,83) , а потоа се вршат корекциите на рН.

РЕЗУЛТАТИ

Валидацијата на методите е направена така што прво е изработен скрининг (Инхибиција /Забрзување), а потоа се врши валидација на три серии. Употребувани се реагенси од Lonza, лизат со сензитивност $l = 0,01$ EU/ml; $MVD = ELC/l = 0,5 / 0,01 = 50$. За тестот Инхибиција /Забрзување кај двата раствора направени се следните разредувања: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 и 1:50.

Концентрираниот р-р за хемодијализа AMINAL-100B покажува инхибиција вклучувајќи го разредувањето1:4. Инхибицијата се надми-

нува при разредување 1:8 кое даде PPC recovery 81%. Врз основа на добиените резултати од скринингот извршена е валидација на три серии Концентриран р-р за хемодијализа AMINAL-100B со дилуција 1 : 10 и при тоа се добиени резултати < 0,100EU/ml.

Концентрираниот р-р за хемодијализа AMINAL-100K ја инхибира реакцијата што се должи на нискиот рН, затоа прво му се дотерува рН со 0,1 N NaOH, а потоа се врши дилуција до MVD. Бидејќи нема инхибиција на реакцијата по корекција на рН, за валидација на три серии се користи дилуција 1 : 2. Кај трите валидирани серии добиени се резултати < 0,020 EU/ml.

ЗАКЛУЧОЦИ

Успешно е направена валидација на методолошката постапка за одредување на бактериски ендотоксини и донесени се следните заклучоци:

- » Надмината е инхибицијата на Концентрираниот р-р за хемодијализа AMINAL-100B. При рутинско одредување да се работи со разредување 1 : 10.
- » Надмината е инхибицијата на Концентрираниот р-р за хемодијализа AMINAL-100K. При рутинско одредување да се работи со разредување 1 : 2, по дотерувањето на рН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ph. Eur. 7 (2.6.14) & Haemodialysis solutions ;
2. LAL Times Vol.8, No1 MARCH 2001;
3. PYROGENIC REACTIONS DURING HÆMODIALYSIS CAUSED BY EXTRAMURAL ENDOTOXIN; The Lancet, Volume 306, Issue 7938
4. EDTNA/ERCA Guidelines: Technical Section; Quality assurance for dialysis-quality water and dialysis fluid
<http://www.edtnaerca.org/pdf/education/WTguidelinesmicrob.pdf>
5. FDA - Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Food and Drug Administration.
6. ENDOTOXINS, Kevin L. Williams

DEVELOPMENT OF AN HPLC METHOD FOR RELATED AND DEGRADATION PRODUCTS IN LOSARTAN FILM COATED TABLETS

Marija Spasevska, Gordana Evgenievska, Mena Ivanovska, Tatjana Bogovska, Hristina Babunovska

Quality Control Department, AD Alkaloid-Skopje, Pharmaceutical, Chemical and Cosmetic Company, A. Makedonski 12, Skopje, Macedonia

Losartan is an angiotensin II receptor antagonist drug used mainly to treat high blood pressure (hypertension). It may also delay progression of diabetic nephropathy and reduce renal disease progression. It is recommended as first-line medicine for younger patients under 55 who cannot tolerate ACE inhibitor.

Our aim was to develop an HPLC method for related and degradation products of Losartan in our finished product Losartan film coated tablets that evaluate all impurities declared by European Pharmacopoeia.

The European Pharmacopoeia specifies impurities D, J, K, L and M. There are 7 more impurities that are declared as other detectable impurities (B, C, E, F, G, H and I) for which is not necessary to be identi-

fied. Imp. B, Imp. C (losartan isomer), Imp. D (BCFI), Imp. E (methylbiphenyl tetrazole), Imp. F (isopropyl losartan), Imp. G (tritanol-triphenylmethanol) Imp. H (N-trityl losartan), Imp. I (O-trityl losartan), Imp. J (O-acetyl losartan) and Imp. K (losartan aldehyde) are process related and Imp. L (losartan degradant-1) and Imp. M (losartan degradant-2) are process/degradation impurities. The identification of the impurities is made by comparison of the chromatogram supplied with losartan for system suitability CRS with the chromatogram gained from the standard solution made from losartan for system suitability CRS containing impurities J, K, L, M, spiked with standard of Imp. G. The system suitability criteria is the peak-to-valley ratio of minimum 2.0 between Imp. M and Imp. G from this solution. The European Pharmacopoeia method is applicable for all 12 impurities.

Our method is different from this method but applicable for the same impurities and gives better chromatography and suitability.

The method that was developed is a gradient method with constant flow rate. The column is Hypersil BDS 250mm x 4.6mm i.d., 5 µm at room temperature. The mobile phase A is phosphate buffer pH=2.5 and mobile phase B is Acetonitrile.

The detection is at 230nm and the injection volume is 20 µl. The solvent is a mixture of acetonitrile and water, in ratio 80:20.

The system suitability parameter that needs to be achieved in the pharmacopoeia is a peak-to-valley between Imp. M and Imp. G, which is after Imp. M in the chromatogram.

In our method the order of elution for Imp. G is changed and it is before Imp. M but the separation is significant. The achieved resolution between those peaks is 8.12. The order of the other impurities from the standard for system suitability (J, K, L and M) is as the one from the chromatogram supplied with losartan for system suitability CRS. There is a very good separation between all the identified peaks of impurities: D, J, K, L, M and G and Losartan peak.

The Relative Retention Times of the specified impurities with respect to the Losartan peak were calculated and are as follows:

Imp. D-0.54, Imp. J-1.59, Imp. K-1.72, Imp. L-2.11, Imp. M-2.46.

The Response Factor for Imp. D was calculated and is 0.14.

The method was validated through Specificity, Limit of Detection and Quantitation, Linearity and Range, Accuracy, Precision, Robustness, Filter retention studies and Stability of solutions.

REFERENCES

1. Drug Master File-Losartan Potassium (Aurobindo Pharma Limited)
2. Ph. Eur. 6.0
3. Validating chromatographic methods, A practical guide, David M. Bliesner
4. <http://www.drugs.com/search.php?searchterm=losartan>

РАЗВОЈ НА HPLC МЕТОДА ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА СРОДНИ И ДЕГРАДАЦИОНИ ПРОДУКТИ ВО ЛОСАРТАН ФИЛМ ТАБЛЕТИ

Марија Спасевска, Гордана Евгениевска, Мена Ивановска, Тајана Боговска, Христина Бабуновска

Контрола на квалитет, АД Алкалоид-Скопје, Фармацевтска, Хемиска и Козметичка Компанија, А. Македонски бр.12, Македонија

Лосартанот е антагонист на ангиотензин 2 рецепторите кој се користи главно за лекување на висок крвен притисок (хипертензија). Може да се користи и за одложување на дијабетска нефропатија и за намалување на прогресијата на ренални заболувања. Се препорачува како лек од примарен избор кај пациенти помлади од 55 години кои не може да го толерираат ACE инхибитор.

Нашата цел беше да развиеме HPLC метода за сродни и деградациони продукти на Losartan во нашиот препарат Лосартан филм таблети, која ќе ги опфати сите онечистувања декларирани со Европската Фармакопеја.

Европската Фармакопеја ги специфицира онечистувањата D, J, K, L и M. Има уште 7 други онечистувања кои се декларирани како други онечистувања што може да се детектираат (B, C, E, F, G, H и I) кои не е потребно да се идентифицираат.

Онечистувањето B, Онечистувањето C (losartan isomer), Онечистувањето D (BCFI), Онечистувањето E (methylbiphenyl tetrazole), Онечистувањето F (isopropyl losartan), Онечистувањето G (tritanol-triphenylmethanol) Онечистувањето H (N-trityl losartan), Онечистувањето I (O-trityl losartan), Онечистувањето J (O-acetyl losartan) и Онечистувањето K (losartan aldehyde) се онечистувања поврзани со производствениот процес, а Онечистувањето L (losartan degradant-1) и Онечистувањето M (losartan degradant-2) се онечистувања поврзани со производствениот процес/деградациони продукти. Идентификацијата на онечистувањата се прави со споредба на хроматограмот што се добива со стандардот losartan за соодветност на системот CRS и добиениот хроматограм од стандардниот раствор направен од тој стандард кој ги содржи онечистувањата J, K, L, M, спакуван со стандард од онечистувањето G. Условот за соодветност на системот е peak-to-valley однос од минимум 2.0 помеѓу онечистувањето between M и онечистувањето G од овој раствор.

Методот во Европска Фармакопеја се користи за сите 12 онечистувања. Нашата метода е различна од таа и исто така применлива за истите онечистувања, со тоа што дава подобра хроматографија и соодветност.

Развиената метода е со градиентен однос на мобилните фази при константен проток. Колоната е Hypersil BDS 250mm x 4.6mm i.d., 5 μ m, на собна температура. Мобилната фаза A е фосфатен пуфер со pH=2.5, а мобилната фаза B е Ацетонитрил.

Детекцијата се врши на бранова должина од 230nm, а волуменот на инјектирање е 20 μ l. Растворувачот што се користи е ацетонитрил: вода, во однос The 80:20.

Параметарот за соодветност на системот според Европска Фармакопеја што треба да се исполни е peak-to-valley помеѓу онечистувањето M и онечистувањето G, кое излегува после онечистувањето M на хроматограмот.

Со нашата метода редоследот на елуирање на онечистувањето G е

променет и сега излегува пред онечистувањето M, но разделувањето е значително. Постигнатата резолуција меѓу пиковите е 8,12. Редоследот на елуирање на останатите онечистувања од стандардот за соодветност на системот (J, K, L и M) е ист како тој од хроматограмот за стандардот losartan за соодветност на системот CRS.

Постои многу добро разделување помеѓу сите идентификувани пикови на онечистувањата D, J, K, L, M и G и пикот на Losartan.

Пресметани се релативните ретенциони времиња на специфицираните онечистувања во однос на пикот на Losartan и се добиени следните вредности:

Онечистување D - 0.54, Онечистување J - 1.59, Онечистување K - 1.72, Онечистување L - 2.11, Онечистување M - 2.46.

Response факторот на онечистувањето. D е пресметан и неговата вредност е 0.14.

Методата е валидирана преку, специфичност, лимит на детекција и квантификација, линеарност и опсег, точност, прецизност, робустност, задршка при филтрирање и стабилност на раствори.

РЕФЕРЕНЦИ

1. Drug Master File-Losartan Potassium (Aurobindo Pharma Limited)
2. Ph. Eur. 6.0
3. Validating chromatographic methods, A practical guide, David M. Bliesner
4. <http://www.drugs.com/search.php?searchterm=losartan>

PRODUCT QUALITY REVIEW

Verec Jovanovska Jankovska, Jasminka Veleska Ivanovska, Sonja Sterjevaska, Miroslava Ilievaska

Alkaloid AD Skopje, Blvd. Aleksandar Makedonski 12, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

INTRODUCTION

Product Quality Review is regular periodic or rolling quality reviews of all licensed medicinal products, including export only products, which are conducted with the objective of verifying the consistency of the existing process, the appropriateness of current specifications for both starting materials and finished product to highlight any trends and to identify product and process improvements¹.

There are significant differences between the United States and European Union requirements for the annual review of records related to the manufacturing and control for pharmaceutical products and active pharmaceutical ingredients².

The Product Quality Review is an effective quality improvement tool to enhance the consistency of the process and the overall quality of the product. The PQR will capture a broader view of product data, capturing trends and will help determine the need for revalidation and changes if any¹.

SCOPE

The purpose of the document is to communicate expectations with regard to the conduct of Product Quality review. Product Quality Review is a GMP requirement listed under Chapter 1 of the PIC/s GMP guide for medicinal product effective since 1 January 2006. Product Quality Review^{3,4}.

METHODS

There are 12 spots in product that should be outlined within one PQR³: A review of starting materials and product contact primary packaging materials used for the product especially those from new sources, a review of critical in process controls and finished product results, a review of all batches that failed to meet established specification(s) and their investigation, a review of all significant deviations or non-conformances, their related investigation, and the effectiveness of resultant corrective and preventive actions taken, a review of all changes carried out to the processes or analytical methods, a review of Marketing Authorization variation submitted/granted/refused/, a review of the results of the stability monitoring program and any adverse trends, a review of quality related product returns, complaints and recalls and the investigation performed at the time, a review of adequacy of any other previous product process or equipment corrective actions, for new marketing authorizations post marketing commitments, the qualification status of relevant critical equipment and utilities, a review of technical agreements to ensure that they are up to date¹. Microsoft office tools were used to calculate average, max, min, standard deviation, relative standard deviation. Statistical tools were used in a manner to achieve potential capability (CP), capability ratio (CR), demonstrated excellence (Cpk), non-centering correction (K), $\pm 3s$ limits, results (observed, expected), above specification limit (observed, expected), below specification limit, Std. skewness, Std. kurtosis, run tests [(to outline some trends and searches for and identifies any unusual patterns in the data. This is helpful in detecting processes which are slowly drifting away from target, even though no points fall outside the control limits (3 sigma)], individual and moving range.

Analysis of Lisinopril tablets 20 mg was performed for period of 01.01.2009 - 31.12.2009. Three year analysis of the results was also performed, using the same Statistical and Microsoft office tools.

OBTAINED RESULTS

Regarding the review of the Lisinopril tablets 20mg obtained results for starting materials as well as finished product were within specification limits.

CONCLUSION

All the data for drug product Lisinopril tablets 20mg for 2009 as well as taking into consideration three years period (2007-2009) and other relevant information, can confirm that process is in the state of control⁵.

REFERENCES

- 1 HEALTH SCIENCES AUTHORITY - Guidance notes on Product Quality Review
- 2 Product Annual/Quality Review: US-EU Comparative Analysis and Interpretations
- 3 PIC/s - Guide to good manufacturing practice for medicinal products - part I
- 4 Eudralex - The rules governing medicinal products in the European union - Volume 4 EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary use - Part 1 chapter 1 Quality Management
- 5 Western Electric Rules (zone rules), 1956

ПРЕГЛЕД НА КВАЛИТЕТ НА ПРОИЗВОДОТ

Верче Јовановска Јанковска, Јасминка Велевска
Ивановска, Соња Стерјевска, Марија Давчева,
Мирослава Илиевска

Алкалоид АД Скопје, Бул. Александар Македонски 12, 1000 Скопје,
Република Македонија

ВОВЕД

Преглед на квалитетот на производот е редовна периодичен или постојан преглед на квалитетот за сите лиценцирани медицински производи, вклучувајќи ги и производите за извоз, кои се спроведуваат со цел проверка на конзистентноста на постојаноста на процесот, соодветноста со тековните спецификации како за влезните материјали така и за готовиот производ за да се потенцираат било какви трендови, и да се идентификуваат подобрувања на производот и процесот¹.

Постојат значајни разлики помеѓу барањата во Соединетите Американски Држави и Европската Унија за годишниот преглед на записите поврзани со производство и контрола на фармацевтските производи и активните фармацевтски ingredienti².

Прегледот на квалитетот на производот е ефикасна алатка за подобрување на постојаноста на процесот и целосниот квалитет на производот. Прегледот на квалитетот на производот опфаќа еден поширок поглед на податоци за производот, земајќи ги предвид трендовите со што овозможува да се одреди потреба од ревалидација и промени доколку ги има¹.

ЦЕЛ

Целта на овој документ е да се поврзат очекувањата за да се изготви добар Преглед на квалитетот на производот. Преглед на квалитетот на производот е барање на Добрата Производна Пракса наведено во поглавје 1 од PIC/s ДПП водич за медицински производи кој важи од 1 Јануари 2006. Преглед на квалитетот на производот^{3,4}.

МЕТОДИ

Постојат 12 точки во производот кои треба да бидат опфатени во рамките на еден преглед на квалитет на производот (PQR)³. Прегледот на влезните материјали и допирот на производот со примарната амбалажа кои се употребуваат за производот, особено оние од нови извори, преглед на важните процесни контроли, и резултатите за готов производ, преглед на сите серии кои не одговараат на воспоставената спецификација и нивно иследување, преглед на сите значајни девијации или неусогласености, нивните соодветни иследувања и ефектот од резултатот на превземените корективни и превентивни мерки, преглед на сите промени кои се однесуваат на процесите или аналитичките методи, преглед на варијациите на Маркетинг Авторизациите поднесени / одобрени / одбиени, преглед на сите резултати при мониторинг на стабилноста и било какви неочекувани трендови доколку ги има, преглед на рекламации кои се однесуваат на квалитетот на производот како и враќање на производот и иследувања спроведени на време, преглед на соодветноста на корективните акции од претходниот произведен процес или опрема за ново решение за ставање во промет и пост маркетинг задолженија, квалификациониот статус на соодветната критична опрема и искористувања, преглед на техничките договори со цел да се осигуриме дека истите се ажурирани¹. Алатките од Microsoft office се употребуваат да се пресметаат средна вредност,

максимум, минимум, стандардна девијација и релативна стандардна девијација. Статистичките алатки се користат за одредување на способност на процес (CP), однос на способноста (CR), demonstrated excellence (Cpk), корекционен фактор (K), $\pm 3\sigma$ граници, резултати (откриени, очекувани), горен спецификационен лимит (откриени, очекувани), долен спецификационен лимит, нагиби на кривата, гуп tests [[да се откријат трендовите или било какво невообичаено однесување на популацијата]. Ова е од помош во откривање на процес кој се отклонува од целта иако ниедна точка не излегува од контролните граници (3 sigma)], ранг.

Беше направена анализа на Lisinopril таблети 20 mg во периодот од 01.01.2009 - 31.12.2009. Исто така беше направена тригодишна анализа на резултатите употребувајќи ги истите статистички и Microsoft office алатки.

ДОБИЕНИ РЕЗУЛТАТИ

Во врска со прегледот на Lisinopril таблетите 20mg добиените резултати за влезните материјали како и готовиот производ се во границите на спецификацијата.

ЗАКЛУЧОК

Сите податоци за лекот Lisinopril таблети 20mg за 2009 земајќи ги во предвид и тригодишниот период (2007-2009) и други релевантни информации, може да се потврди дека процесот е во состојба на контрола⁵.

РЕФЕРЕНЦИ

- 1 HEALTH SCIENCES AUTHORITY - Guidance notes on Product Quality Review
- 2 Product Annual/Quality Review: US-EU Comparative Analysis and Interpretations
- 3 PIC/s - Guide to good manufacturing practice for medicinal products - part I
- 4 Eudralex - The rules governing medicinal products in the European union - Volume 4 EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary use - Part 1 chapter 1 Quality Management
- 5 Western Electric Rules (zone rules), 1956

FIVE YEAR EXPERIENCE IN SPECIAL QUALITY CONTROL IN THE CROATIAN AGENCY FOR MEDICINAL PRODUCTS AND MEDICAL DEVICES

Mikulčić D., Pipić-Kosanović M.,
Truban Žulj R., Tomić S.

Agency for Medicinal Products and Medical Devices, Zagreb, Croatia

INTRODUCTION

For the purpose of placing on the market, the quality, efficacy and safety of each drug product has to be established. Quality control implies the procedure for establishing conformity of medicinal product quality with predetermined quality requirements. It can be performed on a regular basis as a special quality control, off shelf quality control, and as quality control in extraordinary cases. Special quality control means that every single batch of blood and plasma derivatives and other biologicals either manufactured by local manufacturer or imported one has to be analyzed before it could be released on the market.

Quality control must be carried out in line with procedures laid down in the accepted medicinal product documentation accompanying the application for granting the marketing authorization.

MATERIALS AND METHODS

During the period of five years (2005-2009) data for blood and plasma derivatives were collected and summarized for an annual surveillance of circulation of blood and plasma derivatives on the Croatian drug market.

RESULTS

Collected data were analyzed for every year individually over the mentioned period of time for imported drugs and local manufacturer blood and plasma derivatives. They were based on special quality control certificates of first and every batch, off shelf quality control, and as quality control in extraordinary cases. The average ratio of local / imported blood and plasma derivatives examined through these 5 years was 52/48. Although the ratio is in favour of local manufacturer, in last two years there is a trend of decrease of local blood and plasma derivatives (from 87 in 2007 to 45 in 2009) and an increase of the imported ones (from 55 in 2007 to 72 in 2009).

The number of imported drugs increased for 50% during these five years especially between year 2005 and 2006. During the same time number of special quality control certificates issued for local manufacturer were the highest in year 2007 (87) and decreased in 2009 for a 50%.

Number of overall special quality control certificates varied over the selected period of time. From year 2005-2007 there was an increase of number of certificates and it was highest in year 2007 when 142 special quality control certificates were issued. That number shows a slight decrease of 15-20% through years 2008-2009.

CONCLUSION

Over the analyzed period of five years (2005-2009) there was a significant increase of imported blood and plasma derivatives, but due to decrease of number of certificates for local manufacturer blood and plasma derivatives the overall number of certificates decreased too. Role of the special quality control performed by the Croatian Agency is to ensure that only high quality blood and plasma derivatives are being placed on the Croatian market.

ANALYSIS OF PURITY IN AMLODIPINE TABLETS IN CROATIA

G. Benković, M. Sokolić, B. Čudina, R. Truban Žulj,
S. Tomić

Agencija za lijekove i medicinske proizvode RH (HALMED),
Ksaverska cesta 4, Zagreb

INTRODUCTION

In view of an increasing number of generic drugs emerging, a comparative study was performed including the approved amlodipine preparations in the form of tablets marketed in Croatia, to compare purity profiles of generic drugs versus the original medicinal product. Amlodipin was selected as the representative of the increasing group of drugs sharing the common property of being introduced into the organism on a daily basis for a longer period and that are marketed in Croatia in a large and increasing number of generic preparations.

MATERIALS AND METHODS

The samples of the amlodipine tablets were collected from the Croatian market. In choosing samples, the principle criterion was the shelf life, aiming to obtain distribution of different batches of the individual drug in the course of its shelf life. Several batches of each individual medicinal product at different stages of their shelf life were analyzed. Impurities were determined by means of high performance liquid chromatography (HPLC).

RESULTS AND DISCUSSION

Impurity profiles were demonstrated to be specific for each individual drug. Levels of total impurities found in the analysed preparations were ranging from 0.1% to 0.6% per tablet. The highest amount of unspecified impurity was observed at the level of 0.2% in two preparations. All the analyzed drugs meet the specification limits approved by the Croatian Agency for Medicinal Products and Medical Devices (HALMED) in the procedure of granting marketing authorization in the Republic of Croatia.

Original drug, as compared to its generic copies, settled at the lowest levels of total impurities. The comparison of impurity profiles and the levels of total impurities as well as of average values of the same parameters indicates to the existence of differences in manufacturing processes, quality of drug substances or formulation's stability.

CONCLUSION

Although there is a relative discrepancy in purity levels among the preparations, it can be generally concluded that all the analyzed medicinal products are within the ranges of approved specification limits. Therefore, it is not expected, in case of amlodipine tablets, for the administration of any specific preparation, as compared to others, to be safer for the patient.

REFERENCES

1. Tomić, S., et al., Granting marketing authorisation for medicines in South East European countries: The point of view of the authority, Regul Toxicol Pharmacol 57 (2010) 325-332
2. S. Görög, Drug safety, drug quality, drug analysis, J Pharm Biomed Anal 48 (2008) 247-253
3. A. K. Basak et al., Pharmaceutical impurities - Regulatory perspective for Abbreviated New Drug Applications, Adv Drug Deliv Rev 59 (2007), 64-72
4. S. Görög, The importance and the challenges of impurity profiling in modern pharmaceutical analysis, Trends Anal Chem 25 (2006) 755-757
5. B. A. Olsen, B. C. Castle, D. P. Myers, Advances in HPLC technology for the determination of drug impurities, Trends Anal Chem 25 (2006) 796-805
6. R. Nageswara Rao, V. Nagaraju, An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs, J Pharm Biomed Anal 33 (2003) 335-377
7. S. Ahuja, Assuring quality of drugs by monitoring impurities, Adv Drug Deliv Rev 59 (2007), 3-11
8. Y. Gomez, E. Adams, J. Hoogmartens, Analysis of purity in 19 drug product tablets containing clopidogrel - 18 copies versus the original brand, J Pharm Biomed Anal 34 (2004) 341-348
9. European Pharmacopoeia, European Pharmacopoeia, 6, Council of Europe, Strasbourg, (2007), 2277-2279
10. Act on medicinal products, 2007, Official Gazette of the Republic of Croatia, 71/07.

HPLC METHODS COMPARISON FOR RELATED AND DEGRADATION PRODUCTS IN SKOPRYL (LISINOPRIL) TABLETS

Cveta Dolikoska, Dafinka Damcevska, Blagica Samarova-Stoev, Ana Aleksandric, Hristina Babunovska

AD Alkaloid-Skopje

Lisinopril is a drug of the angiotensin-converting enzyme (ACE) class that is primarily used in treatment of hypertension, congestive heart failure and heart attacks and also in preventing renal and retinal complications of diabetes. Lisinopril is the lysine-analog of enalapril. Lisinopril is hydrophilic, has a long half-life and tissue penetration, and is not metabolized by the liver.

Our aim was to compare the two different HPLC methods for related and degradation products of Lisinopril in our finished product Skopryl tablets. The method for related and degradation substances in Lisinopril tablets according to BP -a little bit adjusted for better chromatography for our internal use-is a simple isocratic method. The column is LiChrospher RP 8 250mm x4 mm 5 µm, the mobile phase is 70% of KH₂PO₄ and Sodium hexan sulphonate buffer pH 2 and 30 % of Acetonitrile, flow rate of 1ml/min, detection at 215 nm, temperature of the column 40°C, injection volume of 20 µl. The diluent is mixture of 80% water and 20% of methanol. The system suitability parameter that is needed is the resolution factor between the peaks due to Lisinopril diketopiperazine and Lisinopril that should be at least 5. There is only one impurity that is limited by the requirements of this monograph: Lisinopril diketopiperazine which is detected as one peak and actually is a racemic mixture of S,S,S diketopiperazine or Lisinopril dihydrate Impurity C and R,S,S diketopiperazine or Lisinopril dihydrate Impurity D.

These are only two impurities from the six specified impurities declared in the European pharmacopoeia:

- » Impurity A-Process related Impurity
- » Impurity B- Process related Impurity
- » Impurity C-S,S,S diketopiperazine - Process related and degradation Impurity
- » Impurity D- R,S,S diketopiperazine Process related and degradation impurity
- » Impurity E-Lisinopril R,S,S-isomer-Process related Impurity
- » Impurity F-cyclohexyl analogue-Process related Impurity

So that's why we developed and validated additional reliable method, adjusted from the Ph.Eur.method for our finished drug products Skopryl 5, 10 and 20mg tablets. The new method has ability to differentiate the active ingredient from all closely related process and degradative impurities. Optimisation of the method was achieved using LiChrospher RP 8 250mm 4.6mm ; 5 µm column ,gradient elution with Sodium dihydrogen phosphate buffer solution pH 5 and Acetonitrile mixed in mobile phase A and mobile phase B,with a flow rate from 1.8 to 2 ml/min.The detection is at 210 nm, temperature of the column is 50°C,injection volume of 20 µl.The first condition for system suitability to be achieved is :

- The chromatogram obtained from the Lisinopryl dihydrate for performance test is similar to the chromatogram supplied with Lisinopryl dihydrate for performance test CRS in which the peaks due to impurity A and Impurity E fall on either side of the peak due to lisinopril.The second condition is:

- the peak-to-valley ratio: minimum 9 between Impurity A and Lisinopril and minimum 9 between Lisinopril and Impurity E. Complete validation of the method is performed, even resolution and not only p/v is achieved between Impurity A and Lisinopril of about 3.42 and between Lisinopril and Impurity E of about 3.74. The relative retention times of the known impurities with reference to Lisinopril peak were calculated and are as follows: Impurity B 0.70; Impurity A 0.79; Impurity E 0.32; Impurity F 2.26; Impurity D 2.63; Impurity C 2.85. The correction factor for each impurity is also incorporated in the method and their values are: 1 for Impurity B; 0.89 for Impurity A; 1.18 for Impurity E; 2.37 for Impurity F; 1.30 for Impurity D; 1.27 for Impurity C. From our conducted stability studies for Skopryl (Lisinopril) tablets we have concluded that our products is very stable during its shelf life. The both methods are equally reliable for analyzing the related and degradation products. The conclusion is that the second method is added to our internal standard for analysis of Skopryl tablets as a second additional method, only in case of need for identification of any unknown impurities greater than the specification limits found with the first method.

REFERENCES

1. British Pharmacopoeia 2010
2. European Pharmacopoeia 6.0
3. Drug Master File-Ranbaxy Laboratories Ltd
4. Drug Master File-Aurobindo Pharma Ltd
5. David M Blesner, Validating chromatographic methods, a practical guide

СПОРЕДБА НА ДВЕ HPLC МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗА НА СРОДНИ И ДЕГРАДАЦИОНИ ПРОДУКТИ ВО СКОПРИЛ (ЛИЗИНОПРИЛ) ТАБЛЕТИ

Цвета Долиќоска, Дафинка Дамчевска, Благоица Самарова-Стоев, Ана Александриќ, Христина Бабуновска

АД Алкалоид - Скопје,

Лизиноприл спаѓа во групата на инхибитори на (АКЕ) Ангиотензин конвертирачки ензим кои примарно се користат во третман на хипертензија, конгестивна срцева слабост и срцеви удари, а истотака во превенција на реналните и ретиналните компликации кај болните од шеќерна болест. Лизиноприлот е лизински аналог на еналаприлот. Тој е хидрофилна супстанца, има долг полуживот и тивна пенетрација и не се метаболизира во црниот дроб.

Наша цел е да ги споредиме двете различни HPLC методи за одредување на сродните и деградациони продукти на Лизиноприлот во нашиот готов производ - Скоприл таблети.

Методата за сродни и деградациони продукти во Лизиноприл таблети според Британска фармакопеја-адаптирана поради подобро хроматографирање за наша интерна употреба е едноставна изократска метода. Методата се работи на LiChrospher RP 8 колона со димензии 250mm x 4 mm

5 μm, мобилната фаза е мешавина од 70% пуфер со рН вредност 2 (Калиум дихидроген фосфат и Натриум хексан сулфонат) и 30%

Ацетонитрил, протоколот е 1 ml во минута, детекцијата на 215 nm, температурата на колоната е 40°C, а волуменот на инјектирање 20 μl. Растворувачот е мешавина од 80% вода и 20% Метанол. Воспоставен параметар за соодветност на системот е резолуција помеѓу пиковите кои потекнуваат од Lisinopril diketopiperazine и Lisinopril, а условот кој треба да се постигне и е постигнат е: Резолуцијата помеѓу тие два пика да не биде помала од 5. Со барањата на оваа монографија се идентификува и квантифицира само едно познато онечистување: Lisinopril diketopiperazine кое се детектира како еден пик а всушност е рацемска смеса од S,S,S diketopiperazine или Онечистување C и R,S,S diketopiperazine или Онечистување D. Овие се само две од познатите онечистувања од вкупно шесте кои се декларирани во Европската Фармакопеја:

- » Онечистување А- Онечистување кое потекнува од производниот процес
- » Онечистување В- Онечистување кое потекнува од производниот процес
- » Онечистување С - S,S,S дикетопиперазин - Онечистување кое потекнува од производниот процес и деградационо онечистување
- » Онечистување D- R,S,S дикетопиперазин - Онечистување кое потекнува од производниот процес и деградационо онечистување
- » Онечистување Е - Лизиноприл R,S,S-изомер-Онечистување кое потекнува од производниот процес
- » Онечистување F- циклохексил аналог- Онечистување кое потекнува од производниот процес

Тоа е причината поради која развиеме и валидиравме дополнителна соодветна интерна метода адаптирана по монографијата од Европска фармакопеја за нашиот готов производ Скоприл таблети од 5, 10 и 20 mg. Новата метода има способност да ја раздвои активната супстанца од сите блиски сродни и деградациони супстанции, тие да се идентификуваат и соодветно да се квантифицираат. Оптимизација на методата постигнавме користејќи LiChrospher RP 8 колона со димензии 250mm x 4.6mm 5 μm, со градиентно елуирање користејќи Натриум дихидроген фосфатен пуферен раствор со рН 5 и Ацетонитрил измешани во Мобилна фаза А и Мобилна фаза В. Протоколот се менува од 1,8 до 2 ml во минута, детекцијата е на 210nm, температурата на колоната е 50°C, волуменот на инјектирање е 20 μl. Првиот услов за соодветност на системот кој треба да се постигне е:

- Хроматограмот добиен со хроматографирање на референтниот стандард Лизиноприл дихидрат за перформанс тест е сличен со хроматограмот доставен за тој стандард од Европска Фармакопеја каде што пиковите од Онечистување А и Онечистување Е се наоѓаат на обете страни од пикот кој потекнува од Лизиноприлот. Вториот услов е:

- peak-to-valley однос: минимум 9 помеѓу Онечистување А и Лизиноприл и минимум 9 помеѓу Лизиноприл и Онечистување Е. Направена е комплетна валидација на методата, дури и резолуција наместо p/v однос е постигната од околу 3,42 меѓу Онечистување А и Лизиноприл и околу 3,74 меѓу Лизиноприл и Онечистување Е. Пресметани се и релативните ретенциони времиња на познатите онечистувања во однос на пикот на Лизиноприл кои изнесуваат: Онечистување В 0.70; Онечистување А 0.79; Онечистување Е 0.32; Онечистување F 2.26; Онечистување D 2.63; Онечистување С 2.85. Корекциони фактори за пресметување на вредностите на секое онечистување се исто така вклучени во методата. Нивните вредности се: 1 за онечистување В, 0,89 за Онечистување А, 1,18 за Онечистување Е, 2,37 за онечистување F, 1,30 за онечистување D и 1,27 за онечистување С.

Од следењето на стабилност на овој препарат, од студиите за стабилност е заклучено дека нашиот производ е многу стабилен за време на неговиот рок на траење. Двете методи се подеднакво соодветни за анализирање на сродните и деградациони продукти. Заклучокот е дека втората метода е додадена само како дополнителна метода на нашиот интерен стандард -Аналитичка процедура за анализа на сродни и деградациони продукти во Скоприл (Лизиноприл) таблети, само во случај да е потребна идентификација на било кое непознато поединечно онечистување над дозволените спецификациони граници добиено со анализирање на производот со првата метода.

РЕФЕРЕНЦИ

1. Британска Фармакопеја 2010
2. Европска Фармакопеја 6.0
3. Drug Master File-Ranbaxy Laboratories Ltd
4. Drug Master File-Aurobindo Pharma Ltd
5. David M Blesner, Валидација на хроматографски методи, практичен водич

HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF RELATED AND DEGRADATION SUBSTANCES IN AMLODIPINE ALKALOID® TABLETS

M. Dobrkovic, V. Dubrova-Koceva, S. Naumovska, N. Stojanovska, H. Babunovska

Quality Control department, AD Alkaloid-Skopje, Pharmaceutical, Chemical and Cosmetic Company, A. Makedonski 12, Skopje, Macedonia

Amlodipine is a dihydropyridine calcium antagonist or long-acting calcium channel blocker, widely used in treatment of hypertension and coronary artery disease. The use of Amlodipine as a hypertension drug is highly common, as it acts as a peripheral arterial vasodilator, on the other hand its precise use in treatment of angina is not fully delineated.

The purpose of our work was to develop and validate a reliable and sensitive HPLC method for quantitative determination of related and degradation substances in our finish product Amlodipine tablets.

The optimal chromatographic separation was achieved using a YMC Pack ODS AQ column, 250 x 4,6 mm; 5µm, with mobile phase containing mixture of phosphatic buffer pH = 3,5 (mobile phase A) and methanol (mobile phase B), with gradient elution mode and constant flow rate, 1 ml/min. UV detection was at 237 nm, room temperature of the column and injection volume of 20 µl .

These chromatographic conditions allowed separation of Amlodipine from its related and degradation impurities A, B, E, G, which are formed during the process of synthesis, Impurity D which is a degradation product generated due to oxidation of amlodipine base and Impurity F . The relative retention times of Impurities A, B, D, E, F, and G were calculated according to the retention time of Amlodipine and are given in addition: 7.0, 3.9, 0.7, 1.3, 0.8, and 2.8, respectively. The resolution between benzene sulfonate and Impurity D, and Amlodipine and Impurity F in the resolution solution were 2.34 and 4.25, respectively and system suitability criteria were met.

The identification of the impurities was made by comparison of the chromatograms gained from standard for peak identification CRS and

spiked standard with impurities.

Validation of the HPLC method was performed with concentration of the amlodipine standard 0,005mg/ml, as a target concentration that corresponds to 0,5 % of the test solution. To perform method validation, results obtained by the HPLC method were compared via specificity, linearity and range, accuracy, precision, robustness, quantitation and detection limit, filter retention studies and stability of solution. Our method differs from the method given in the European Pharmacopoeia for determination of impurities in Amlodipine. Given all the facts above, our study provided enough evidence that this method is applicable for determination of the same impurities and is applied for the same purpose in routine quality control and stability studies.

REFERENCE

1. Validating Chromatographic methods, David M. Blesner <http://www.drugs.com/amlodipine.html>
2. Practical HPLC Method Development, 2nd Edition., Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, Joseph L. Glajch
3. HPLC Method Development for Pharmaceuticals, Volume 8 (Separation Science and Technology) 2007, Satinder Ahuja, Henrik Rasmussen
4. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2010, Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, Jonh W. Dolan

HPLC МЕТОДА ЗА ОДРЕДУВАЊЕ НА СРОДНИ И ДЕГРАДАЦИОНИ ПРОДУКТИ ВО AMLODIPINE ALKALOID® ТАБЛЕТИ

М. Добрковиќ, В. Дуброва-Коцева, С. Наумовска, Н. Стојановска, Х. Бабуновска

Контрола на Квалитет, АД Алкалоид-Скопје, Фармацевтска, Хемиска и Козметичка индустрија, А. Македонски 12, Скопје, Македонија

Амлодипин е дихидропиридински калциум антагонист односно блокатор на калциумовите канали со продолжено дејство, кој има широка примена во третманот на хипертензијата и коронарните артериски заболувања. Употребата на амлодипинот во третманот на хипертензијата се должи на неговото дејство како периферен артериски вазодилататор и е добро позната, додека неговата точна улога во третманот на ангина не е доволно објаснета.

Целта на нашата студија беше да развиеме и валидираме сигурна и сензитивна HPLC метода за квантитативно одредување на сродни и деградациони продукти во нашиот краен продукт, Амлодипин таблети.

Оптималната хроматографска сепарација беше постигната со употреба на YMC Pack ODS AQ колона, 250 x 4,6 mm; 5µm, со мобилна фаза која е мешавина од фосфатен пуфер pH = 3,5 (мобилна фаза А) и метанол (мобилна фаза Б), градиентна елуција и константен проток од 1мл/мин. УВ детекцијата беше изведена на 237 nm, на собна температура и волумен на ињектирање од 20 µl .

Овие хроматографски услови овозможуваат одделувањето амлодипинот од неговите сродни и деградациони продукти А, В, Е, Г, кои потекнуваат од процесот на синтеза, D кое се создава како деградационен продукт при оксидацијата на амлодипин база и F. Релативните ретенциони времиња на онечистувањата А, В, Д, Е, F, и Г беа пресметани во однос на ретенционото време на амлодипинот и се следниве: 7.0, 3.9, 0.7, 1.3, 0.8, и 2.8, соодветно. Резолуцијата меѓу пиковите добиени од benzene sulfonate и Impurity D, и

Amlodipine and Impurity F во резолуциониот раствор беше пресметана и изнесува 2.34 и 4.25, соодветно, со што беа исполнети условите за соодветност на системот.

Идентификацијата на онечистувањата беше направена со споредување на хроматограмите добиени од стандардот за пик идентификација и спајкуван стандард со онечистувањата.

Валидацијата на HPLC методата беше изведена со концентрација на амлодипин стандардот од 0,005мг/мл, како таргет концентрација што одговара на 0,5% од растворот на пробата. Со споредување на резултатите HPLC методата се докажа дека е специфична, линеарна во широк опсег на концентрации, точна, прецизна и робуствна.

Нашата метода се разликува од методата дадена во Европската Фармакопеја за одредување на сродни и деградациони онечистувања во амлодипинот. Со горе наведеното, нашата студија обезбеди доволно докази дека оваа метода е применлива за одредување на истите сродни и деградациони онечистувања во амлодипинот, и се користи за истата цел во рутинските анализи при контрола на квалитет како и во студиите за стабилност.

РЕФЕРЕНЦИ

1. Validating Chromatographic methods, David M. Bliesner <http://www.drugs.com/amlodipine.html>
2. Practical HPLC Method Development, 2nd Edition., Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, Joseph L. Glajch
3. HPLC Method Development for Pharmaceuticals, Volume 8 (Separation Science and Technology) 2007, Satinder Ahuja, Henrik Rasmussen
4. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2010, Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, Jonh W. Dolan

HPLC METHOD VS. UPLC METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF RELATED SUBSTANCES IN METADON CHLORIDE ORAL SOLUTION 10mg/ml

Sanja Despotovska, Mena Ivanoska, Milena Strevzovska, Petranka Petruseva, Hristina Babunovska

Quality Control department, ALKALOID AD, Aleksandar Makedonski 12, 1000 Skopje, Pharmaceutical, Chemical and Cosmetics Company

INTRODUCTION

Methadone, or (RS)-6-(Dimethylamino)-4,4-diphenylheptan-3-one, is a synthetic, long-acting opioid receptor agonist that acts primarily on the μ -opioid receptor. Methadone maintenance is a widely used therapy in the rehabilitation of opioid addiction.

The aim of the present study was to observe and compare results obtained using two methods for quantitative determination of related substances in Metadon Chloride solution 10mg/ml, an in-house HPLC method and an UPLC method.

METHODS AND MATERIALS

Optimal HPLC separation was performed on Varian HPLC chromatographic system and was carried out using LiChrospher 100 RP 8, 250x4mm; 5 μ m, with mobile phase containing mixture of 0.005M sodium pentane sulfonic acid, acetonitrile and phosphoric acid (70:30:2) as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B in ratio 95:5, using isocratic elution mode with flow rate 1.0ml/min and injection

volume 20 μ l. UV detection was performed at 210nm. These conditions allowed separating the following impurities: Impurity A (Isomethadone ketoimine), enantiomer of Levo-Methadone, originating from the route of synthesis; and Impurity B (Methadone nitrile), starting material in the route of synthesis.

Optimal UPLC method transfer was performed on Nexera UHPLC chromatographic system and was carried out using Acquity UPLC BEH C8, 50x2.1 mm; 1.7 μ m, mobile phase containing mixture of 0.005M sodium pentane sulfonic acid, acetonitrile and phosphoric acid (70:30:2) as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B in ratio 95:5, using isocratic elution mode, with flow rate 0.5ml/min and injection volume 0.5 μ l. UV detection was performed at 210nm. These conditions allowed separating the following impurities: Impurity A (Isomethadone ketoimine), enantiomer of Levo-Methadone, originating from the route of synthesis; and Impurity B (Methadone nitrile), starting material in the route of synthesis.

RESULTS

The Relative Retention Times of Isomethadone ketoimine and Methadone nitrile in sample using HPLC method were following: 0.16 and 0.66 respectively, and were calculated according the principal peak in the spiked sample. The Relative Response factors for Isomethadone ketoimine and Methadone nitrile in sample were 0.82 and 1.33 respectively, and were calculated according the UV response of the impurities at the same wavelength with the principal peak in the spiked sample.

Validation of the HPLC method was performed with the concentration of 0.01mg/ml Methadone of the standard solution as a target concentration corresponding to 0.1% of the Methadone test solution used in the determination of chromatographic purity. To perform method validation, results obtained by the HPLC method were compared via specificity, linearity and range, accuracy, precision, quantification and detection limit.

The Relative Retention Times of Isomethadone ketoimine and Methadone nitrile in sample using UPLC method were following: 0.17 and 0.52 respectively, and were calculated according the principal peak in the spiked sample. The Relative Response factors for Isomethadone ketoimine and Methadone nitrile in sample were 0.88 and 1.43 respectively, and were calculated according the UV response of the impurities at the same wavelength with the principal peak in the spiked sample.

CONCLUSION

Numbers of batches of Metadon Chloride, oral solution 10mg/ml were analyzed simultaneously with both methods. With statistical comparison of the results the conclusion is that the UPLC method was found to be simple, accurate, rapid and economical for determination of related substances in Metadon Chloride, oral solution 10mg/ml. Hence, it can be easily and conveniently adopted for routine analysis.

REFERENCES

1. Davy Guillaume, Dao T.T. Nguyen, Serge Rudaz, Jean-Luc Veuthey, "Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particle. Part II: Gradient experiments", 2007
2. Lucie Nováková, Ludmila Matysová, Petr Solich, "Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis", 2005
3. Stephen A.C. Wren and Pierre, Tchelitchev, "Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development", 2004
4. M.E. Swartz, "UPLC: An Introduction and Review", J. Liq. Chrom., 2005
5. J.R. Mazzeo, U.D. Neue, M. Kele, R. Plumb, "Ultra Performance Liquid Chromatography," Anal. Chem., 2005
6. M. Swartz and B. Murphy, "New Frontiers in Chromatography," Am. Lab., 2005

HPLC И UPLC МЕТОДА ЗА КВАНТИТАТИВНО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА СРОДНИ СУПСТАНЦИИ ВО METADON CHLORIDE, РАСТВОР ЗА ОРАЛНА УПОТРЕБА 10mg/ml

Сања Деспотовска, Мена Иваноска,
Милена Стрезовска, Петранка Петрушева,
Христина Бабуновска

*Контрола на квалитет, АЛКАЛОИД АД, Александар Македонски 12,
1000 Скопје, Фармацевтско-хемиско-козметичка индустрија*

ВОВЕД

Метадон, или хемиски (RS)-6-(Dimethylamino)-4,4-diphenylheptan-3-one, претставува синтетски агонист на опиоидните рецептори со долготрајно делување, чие примарно делување е фокусирано врз μ -опиоидните рецептори.

Целта на оваа студија е опсервација и компарација на резултатите, добиени со употреба на две методи за квантитативно определување на сродни супстанции во препаратот Metadon Chloride, раствор за орална употреба 10mg/ml, и тоа, валидирана HPLC метода и соодветна UPLC метода.

МЕТОДИ И МАТЕРИЈАЛИ

Конвенционалата и воедно валидирана, HPLC метода е изведена на Varian HPLC хроматографски систем, со употреба на колона LiChrospher 100 RP 8, со димензии 250x4mm; 5 μ m. Како мобилна фаза за изократско елуирање со проток 1.0ml/min, се употребени смеса од 0.005M натриум пентан сулфонат, ацетонитрил и фосфорна киселина (70:30:2), како растворувач А и ацетонитрил како растворувач Б, во однос 95:5. Примерокот е аплициран на колоната со волумен на инјектирање од 20 μ l. За ултравиолетова детекција е употребена бранова должина од 210nm. Со овие хроматографски услови е овозможено разделување на следните онечистувања Impurity A (Isomethadone ketoimine), енантиомер на Levo-Methadone, кој потекнува од процесот на синтеза; и Impurity B (Methadone nitrile), кој претставува почетен материјал во процесот на синтеза.

Оптималниот UPLC трансфер на методата е изведен на Nexera Shimadzu UPLC хроматографски систем, со употреба на колона Acquity UPLC BEH C8, со димензии 50x2.1 mm; 1.7 μ m. Како мобилна фаза за изократско елуирање со проток 0,5ml/min, се употребени смеса од 0.005M натриум пентан сулфонат, ацетонитрил и фосфорна киселина (70:30:2), како растворувач А и ацетонитрил како растворувач Б, во однос 95:5. Примерокот е аплициран на колоната со волумен на инјектирање од 0,5 μ l. За ултравиолетова детекција е употребена бранова должина од 210nm. Со овие хроматографски услови е овозможено разделување на следните онечистувања Impurity A (Isomethadone ketoimine), енантиомер на Levo-Methadone, кој потекнува од процесот на синтеза; и Impurity B (Methadone nitrile), кој претставува почетен материјал во процесот на синтеза.

РЕЗУЛТАТИ

Релативните ретенциони времиња на онечистувањата Isomethadone ketoimine и Methadone nitrile, пресметани во однос на главниот пик во примерокот, со примена на HPLC метода се 0.16 и 0.66

соодветно. Релативните респонс фактори на онечистувањата Isomethadone ketoimine и Methadone nitrile, пресметани во однос на ултравиолетовиот одговор на главниот пик во примерокот се 0.82 и 1.33 соодветно.

Валидацијата на HPLC методата е изведена во концентрација 0.01mg/ml Methadone во стандардниот раствор, што соодветствува со концентрација од 0.1% Methadone во примерокот за анализа. Валидацијата на методата е изведена преку параметрите специфичност, линеарност и опсег, точност, прецизност, лимит на детекција и лимит на квантификација.

Релативните ретенциони времиња на онечистувањата Isomethadone ketoimine и Methadone nitrile, пресметани во однос на главниот пик во примерокот, со примена на UPLC метода се 0.17 и 0.52 соодветно. Релативните респонс фактори на онечистувањата Isomethadone ketoimine и Methadone nitrile, пресметани во однос на ултравиолетовиот одговор на главниот пик во примерокот се 0.88 и 1.43 соодветно.

ЗАКЛУЧОК

Со овие две методи истовремено се анализирани одреден број производни серии од Metadon Chloride, раствор за орална употреба 10mg/ml. Со статистичка обработка на резултатите може да се заклучи дека соодветната UPLC метода е едноставна, точна, брза и економски оправдана за квантитативно определување на сродни супстанции во Metadon Chloride, раствор за орална употреба 10mg/ml и поради тоа може да се вклучи во рутинската контрола на квалитетот.

REFERENCES

1. Davy Guillaume, Dao T.T. Nguyen, Serge Rudaz, Jean-Luc Veuthey, "Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particle. Part II: Gradient experiments", 2007
2. Lucie Nováková, Ludmila Matysová, Petr Solich, "Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis", 2005
3. Stephen A.C. Wren and Pierre, Tchelitcheff, "Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development", 2004
4. M.E. Swartz, "UPLC: An Introduction and Review", J. Liq. Chrom., 2005
5. J.R. Mazzeo, U.D. Neue, M. Kele, R. Plumb, "Ultra Performance Liquid Chromatography," Anal. Chem., 2005
6. M. Swartz and B. Murphy, "New Frontiers in Chromatography," Am. Lab., 2005

HPLC METHOD VS. UPLC METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF RE- LATED SUBSTANCES IN CEFACLOR CAP- SULES 500mg

Milosh Todorovski, Ana Giceva, Tasika Kovacevic,
Slavica Janeva, Hristina Babunovska

*Quality Control department, ALKALOID AD, Aleksandar Makedonski 12,
1000 Skopje, Pharmaceutical, Chemical and Cosmetics Company*

INTRODUCTION

A typical HPLC method was optimized for UPLC method in order to achieve higher sample analysis throughput, better sensitivity, and robust, rapid, simple, accurate and economic analysis. Method transfer was performed on Cefaclor capsules 500mg, on parameter "Determination of related substances". Cefaclor is a semi synthetic broad-spec-

trum antibiotic and an oral second generation cephalosporin, which is widely used in treatment of variety of both gram positive and gram negative aerobic bacteria. In this work, an HPLC method for quality control (QC) was optimized for UPLC. Strategies to reduce total run-time, lower cost per assay, and promote instrument uptime were considered.

METHODS AND MATERIALS

The original 55-min HPLC QC method which was used to quantify the content of degradation products in Cefaclor capsules 500mg was performed on Varian HPLC chromatographic system, on LiChrospher 100 RP 18, 250 x 4 mm; 5 μ m column, using gradient elution with mobile phase consisting of phosphate buffer (pH 4,0) as mobile phase A and mixture of phosphate buffer (pH 4,0) and acetonitrile as mobile phase B, with flow rate 1.0ml/min and injection volume 20 μ l. Gradient elution was performed in range of 5 to 100 volumes mobile phase B. Wavelength was fixed at 220nm. Cefaclor was separated from the Impurity delta-3-Cefaclor. System suitability parameters, as resolution between Cefaclor and delta-3-Cefaclor, were calculated on the typical chromatogram of the resolution solution.

The UPLC method was performed on Nexera Shimadzu UFLC chromatographic system, on Acquity BEH C 18, 50 x 2.1 mm; 1.7 μ m column, using gradient elution with mobile phase consisting of phosphate buffer (pH 4,0) as mobile phase A and mixture of phosphate buffer (pH 4,0) and acetonitrile as mobile phase B, with flow rate 0.4ml/min and injection volume 1 μ l. Gradient elution was performed in range of 5 to 100 volumes mobile phase B at wavelength of 220nm. Cefaclor was separated from the Impurity delta-3-Cefaclor. System suitability parameters, as resolution between delta-3-Cefaclor and Cefaclor, were calculated on the typical chromatogram of the resolution solution.

RESULTS

The HPLC method was validated with standard solution of delta-3-Cefaclor with concentration of 0.06mg/ml which is equal to 1.2% of the delta-3-Cefaclor test solution used in the determination of the chromatographic purity.

The Retention Times of delta-3-Cefaclor and Cefaclor in the resolution solution using HPLC method were 15.34 and 18.26 respectively, achieving resolution of 7.55. The Relative Retention Time of delta-3-Cefaclor was 0.84.

Run time for the analysis is 55 minutes for UV detection and additional 15 minutes for equilibrating, with total run time of 70 minutes.

Using the transferred UPLC method we achieved separation of the two components with retention times of 4.07 and 4.92 minutes. Resolution between delta-3-Cefaclor and Cefaclor was 4.56 with Relative retention time of delta-3-Cefaclor 0.83.

Achieved run time for the analysis was 18 minutes for UV detection and additional 4 minutes for equilibrating, with total run time of 22 minutes which is 3.18 times faster than the HPLC analysis.

CONCLUSION

The transferred UPLC method has shown that is robust, rapid, simple, accurate and economical and therefore suitable for routine control in the Quality Control department. The results from both HPLC and UPLC analysis of the same batches of Cefaclor capsules 500mg were compared and were found to be identical so using the UPLC method is recommended whenever possible for saving time and money.

REFERENCES

1. Davy Guillaume, Dao T.T. Nguyen, Serge Rudaz, Jean-Luc Veuthey, "Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particle. Part II: Gradient experiments", 2007
2. Lucie Nováková, Ludmila Matysová, Petr Solich, "Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis", 2005
3. Stephen A.C. Wren and Pierre, Tchelitchev, "Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development", 2004
4. M.E. Swartz, "UPLC: An Introduction and Review", J. Liq. Chrom., 2005
5. J.R. Mazzeo, U.D. Neue, M. Kele, R. Plumb, "Ultra Performance Liquid Chromatography," Anal. Chem., 2005
6. M. Swartz and B. Murphy, "New Frontiers in Chromatography," Am. Lab., 2005

НРЛС И UPLC МЕТОДА ЗА КВАНТИТАТИВНО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА СРОДНИ СУПСТАНЦИИ ВО CEFACTOR КАПСУЛИ 500mg

Милош Тодоровски, Ана Гичева, Тасика Ковачевиќ, Славица Јанева, Христина Бабуновска

Контрола на квалитет, АЛКАЛОИД АД, Александар Македонски 12, 1000 Скопје, Фармацевтско-хемишко-козметичка индустрија

ВОВЕД

Со цел да се постигне поголем аналитички капацитет, поголема осетливост и добивање на робуствна, брза, едноставна, точна и економски оправдана анализа, направена е оптимизација на типичен HPLC метод до UPLC метод. Трансферот на методот е изведен на Cefaclor капсули 500mg, на параметарот "Определување на сродни супстанции" Цефаклор претставува полусинтетски антибиотик со широк спектар на делување и цефалоспорин од втора генерација, кој се употребува во третман на инфекции предизвикани од грам-позитивни и грам-негативни аеробни бактерии. Во оваа студија направена е оптимизација на HPLC методот, кој се употребува во контролата на квалитет до UPLC метод. Намалувањето на времетраењето на целокупната анализа, пониските трошоци за иведување на истата и зголемувањето на животниот век на инструментот се земени како стратегии при иведување на студијата.

МЕТОДИ И МАТЕРИЈАЛИ

Оригиналниот HPLC метод, кој трае 55 минути, и се употребува за квантификација на деградационите продукти во Cefaclor капсули 500mg е изведен на Varian HPLC хроматографски систем, со употреба на колона LiChrospher 100 RP 18, со димензии 250 x 4 mm; 5 μ m. Како мобилна фаза за градиентно елуирање со проток 1.0ml/min се употребени фосфатен пуфер (pH 4,0) како растворувач А и смеса од фосфатен пуфер (pH 4,0) и ацетонитрил, како растворувач Б. Градиентното елуирање се движи во опсег од 5 до 100 волумени растворувач Б. Примерокот е аплициран на колоната со волумен на инјектирање од 20 μ l. За ултравиолетова детекција е употребена бранова должина од 220nm. Оваа метода овозможува хроматографско разделување на Cefaclor од онечистувањето delta-3-Cefaclor. Параметрите за соодветност на системот, меѓу кои и резолуцијата помеѓу Cefaclor и delta-3-Cefaclor се пресметани на хроматограмот, кој е добиен од резолуциониот раствор. UPLC методата е изведена на Nexera Shimadzu UFLC хроматографски систем, со употреба на колона Acquity BEH C18, со димензии 50

х 2.1 mm; 1.7 μ m. Како мобилна фаза за градиентно елуирање со проток 0,4ml/min се употребени фосфатен пуфер (pH 4,0) како растворувач А и смеса од фосфатен пуфер (pH 4,0) и ацетонитрил, како растворувач Б. Градиентното елуирање се движи во опсег од 5 до 100 волумени растворувач Б. Примерокот е аплициран на колоната со волумен на инјектирање од 1 μ l. Оваа метода овозможува хроматографско разделување на Cefaclor од неговото онечистување delta-3-Cefaclor. Параметрите за соодветност на системот, меѓу кои и резолуцијата помеѓу Cefaclor и delta-3-Cefaclor се пресметани на хроматограмот, кој е добиен од резолуциониот раствор.

РЕЗУЛТАТИ

HPLC – методот е валидиран со стандарден раствор од delta – 3 – Cefaclor со концентрација од 0.06 mg/ml што е еднакво на 1.2% од delta – 3 – Cefaclor во тест растворот користен за определување на хроматографската чистота.

Ретенционите времиња на delta – 3 – Cefaclor и Cefaclor во резолуциониот раствор користејќи го HPLC методот се 15.34 и 18.26 соодветно, при тоа постигнувајќи резолуција од 7.55. Релативното ретенционо време на delta – 3 – Cefaclor е 0.84.

Времетраењето на анализа за еден примерок изнесува 55 минути за UV детекција и дополнителни 15 минути за еквилибрација до почетната состојба на градиентот, со вкупно времетраење од 70 минути.

Користејќи го трансферираниот UPLC метод постигнавме одделување на двете компоненти со ретенциони времиња од 4.07 и 4.92 минути. Резолуцијата помеѓу delta – 3 – Cefaclor и Cefaclor беше 4.56 со Релативно Ретенционо Време на delta – 3 – Cefaclor од 0.83. Времетраењето на анализа за еден примерок изнесува 8 минути за UV детекција и дополнителни 4 минути за еквилибрација до почетната состојба на градиентот, што е за повеќе од 3 пати пократко во споредба со конвенционалната HPLC метода.

ЗАКЛУЧОК

Трансферираниот UPLC метод се покажа како робустен, едноставен, точен и економичен и затоа е соодветен за рутинска контрола во лабораториите за Контрола на Квалитет. Резултатите и од HPLC и од UPLC анализите од истите серии на примероци од Cefaclor капсули 500mg се споредувани и е заклучено дека се идентични така што користењето на UPLC методот е пожелно и потребно секогаш кога е тоа возможно со цел заштеда на време и пари.

REFERENCES

1. Davy Guillaume, Dao T.T. Nguyen, Serge Rudaz, Jean-Luc Veuthey, "Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particle. Part II: Gradient experiments", 2007
2. Lucie Nováková, Ludmila Matysová, Petr Solich, "Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis", 2005
3. Stephen A.C. Wren and Pierre, Tchelitchef, "Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development", 2004
4. M.E. Swartz, "UPLC: An Introduction and Review", J. Liq. Chrom., 2005
5. J.R. Mazzeo, U.D. Neue, M. Kele, R. Plumb, "Ultra Performance Liquid Chromatography," Anal. Chem., 2005
6. M. Swartz and B. Murphy, "New Frontiers in Chromatography," Am. Lab., 2005

THE ROLE OF TEMPERATURE DEPENDENCE OF CHROMATOGRAPHIC RETENTION COEFFICIENT IN SEPARATION OF BILE ACIDS INTO CONGENERIC GROUPS

Ana Pilipović, Mihaj Poša, Mladena Lalić

Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Hajduk Veljka 3, 21000 Novi Sad, Serbia

INTRODUCTION

This work deals with finding temperature dependence of bile acids' retention coefficient obtained in reversed phase chromatography and its role in separation of bile acids into different congeneric groups. Bile acids with one, two and three hydroxyl group and their glyco-, tauro and oxo derivatives are investigated. Particular attention is paid on bile acids' oxo derivatives that have a growing pharmacological use due to a lower membranolytic activity.

MATERIALS AND METHODS

The HPLC capacity factor was calculated from the obtained eluted peak retention time [1]. Linear equation that connects bile acids' retention coefficient with temperature fits very well with experimental data. Linear model explains 96% to 99% of the whole variance. There is a good correlation between the slope (*b*) and intercept (*a*) in the obtained equation in a group of the examined bile acids.

RESULTS AND DISCUSSION

This correlation indicates the possibility of forming homologous series in the examined bile acids' molecule group [2]. On *a* – *b* plot bile acids form three groups. Lithocholic acid and its' conjugates (bile acids with one hydroxyl group in the steroid skeleton) belong to the first group. In the second group there are deoxycholic and chenodeoxycholic acid and their conjugates while the third group contains bile acids oxo derivatives and next hydroxyl bile acids derivatives: ursodeoxycholic (UD), hyocholic (HC), and hyodeoxycholic acid (HD). For UD, HC and HD molecules it is characteristic that beside C3 hydroxyl group (that has the same spatial orientation in each examined bile acids) they possess additional hydroxyl group with equatorial (*e*) orientation (HC and HD: C6 α (*e*) OH; UD: C7 β (*e*) OH). Oxo groups' oxygen atom has equatorial orientation as well, so it is characteristic for bile acids of the third group that oxygen atoms of the hydroxyl or oxo group are switched to the β side of the steroid skeleton (i.e. toward angular methyl groups). Comparing with molecules of the first and the second group, molecules of the third group possess at least one conformation in which spatial orientation is moved for the 60° minimum in the proper Newmanns' projection formula. The cholic and glycocholic acid belong to the third group as well. Those two molecules structurally (according to the orientation of the hydroxyl group) i.e. conformationally do not show common elements with other molecules from the third group. After implementing PCA method on the same data, on the scatter plot of the scores PC1- PC2 three congeneric groups are formed with identical elements (molecules) as on the plot *a*- *b*. steroid skeleton. Temperature dependence of bile acids' retention coefficient is linear. Parameters of linear dependence (*a*, intercept, and *b*, slope) strongly correlate to a bile acids' structures and this correlation can be used for grouping examined bile acid into three congeneric groups.

The work was financially supported by the Secretariat of Science and Technological Development, AP Vojvodina, Republic of Serbia, Grant No.114-451-2113/2011.

REFERENCES

1. A. Roda, A. Minutello, M. A. Angellotti, A. Finit, J. Lipid Res. 31 (1990) 1433-1443.
2. T. Cserhati, J. Biochem. Biophys. Methods 27 (1993) 133.

VALIDATION OF CLEANING PROCESS FOR EQUIPMENT FOR WET GRANULATION

Gordana Evgenievska, Ana Giceva, Miona Manasova, Vasilka Dubrova, Hristina Babunovska

Quality Control department, ALKALOID AD-Skopje, Pharmaceutical, Chemical, and Cosmetic Company, Aleksandar Makedonski 12,1000 Skopje, Republic of Macedonia

Cleaning of equipment for manufacturing of pharmaceutical dosage forms is required to ensure the quality of finished products. The goal of cleaning is to remove the residue from previous manufactured pharmaceutical dosage forms, cleaning agents and other residues which can be formed in manufacturing process. Validation of cleaning process is necessary to be done for all equipment which are in direct contact with pharmaceutical dosage forms and equipment where the manufacturing process of different pharmaceutical products takes place.

The whole concept for cleaning validation includes many aspects of cleaning cycle: design of manufacturing equipment which should be cleaned, cleaning agents, the process which is used for the cleaning and what is most important for this study, the analytical methods which are used for determination the present residues.

The aim of this paper is to explain the validation the process of removing the residues of active substance -Propafenone HCl of pharmaceutical dosage form Propafenon tbl 150 mg from equipment for wet granulation.. Validation of cleaning process is done after manufacturing of three successive series of product which is chosen to be the "worst case". For that aim specific HPLC method is used for determining the presense of residues of Propafenone HCl and getting realible results of present residues which are under acceptable limits of 10 ppm.

Product which is worst case for water cycle is Propafenone tbl 150 mg for equipment for wet granulation. Sensitivity of the analytical method should be low enough to correspond to the calculated limits so the special challenge of the analytical method is the opportunity to detect the contaminants on very low level.

The method is carried out on column : RP Select B 250 x 4mm; 5 µm., with mobile phase : A41 % (buffer which is a mixture composite of 0.5 mg-ml sodium hexane sulphonate and 1 ml/min acetic acid) : B 48 % (methanol) : C 11 % (acetonitrile). The flow is 1ml/min, volume of injection is 20 µm and wavelength is 250 nm.

From obtained results of the validation of the analytical method it can be concluded that the results are within the acceptable limits for the validation of analytical method ,which means that proposed and validated analytical method is appropriate for determinating the residues of active substances Propafenone HCl of Propafenone tbl 150 mg.

After estimating the suitability and validation of the analytical method and after calculation of the acceptable limits of contaminants, the control of the efficiency of the cleaning process is performed. The efficiency of cleaning process is based on obtained results ,from taken examples after the equipment is cleaned. The examples are taken after manufacturing of three subsequent series of Propafenon tbl 150mg , and after that, it can be estimated that the validation of cleaning process of equipment for wet granulation is successfully completed.

The results from the taken examples from three subsequent series of solid dosage forms as worst case from the place which is most difficult to clean , are under acceptable limit for permitted contamination of 10 ppm, which means that it is confirmed that the cleaning process is secured and efficiently for removing the residues.The upper limit for determinated residue is 2,32 ppm, after the cleaning of manufacturing of the Propafenon tbl 150 mg with water cycle , which is much lower then permitted limit of 10 ppm..

The cleaning process is validated , which means that the evidence is obtained for efficiently removal of residues from the manufacturing equipment for of solid dosage forms .The residues are below the acceptable limits, which means that they doesn't affect the security of the patients.

REFERENCES

- 1.Fourmen G.L and V.Mullen, " Determining Cleaning Validation Acceptance Limits for Pharmaceutical Manufacturing Operations ", Pharm. Technology 54-60 (April 1993).
- 2.LeBlanc D.A., "Sampling Analyzing and Removing Surface Residues Found in Pharmaceutical Manufacturing ", Pharm Technology 84-92 (July 1993).
- 3.Gil Bizmuth and Sosh Neumen, "Cleaning Validation-a practical approach ",Informa Healthcare USA (2007).
- 4.FDA, "Guide to inspections of Validation of Cleaning process", Washington (July 1993).
5. FDA,MID Atlaticn region inspection guide , "Cleaning validation"(May 1993).

ВАЛИДАЦИЈА НА ПРОЦЕСОТ НА ЧИСТЕЊЕ НА ОПРЕМА ЗА ВЛАЖНО ГРАНУЛИРАЊЕ

Гордана Евгениевска, Ана Гичева, Миона Манасова, Василка Дуброва, Христина Бабуновска

Контрола на квалитет, АЛКАЛОИД АД-Скопје, Фармацевтска, Хемиска и Козметичка Компанија, Александар Македонски 12, 1000 Скопје, Република Македонија

Чистење на опрема за производство на фармацевтски дозирани форми е предуслов за обезбедување на квалитет на готовиот производ. Чистењето се изведува со цел да се отстранат можните контаминенти од претходно произведените фармацевтски дозирани форми, средства за чистење и останати контаминенти кои можат да настанат во текот на производниот процес. Валидацијата на процесот на чистење е потребно да се направи за сите опреми што се во директен контакт со фармацевтски дозирани форми и во кои се произведуваат повеќе фармацевтски производи.

Целиот концепт за валидација на чистење вклучува многу аспекти од циклусот на чистење и тоа : дизајнот на производствената опрема што треба да се чисти, средства за чистење, процесот што се користи за чистење и што е најважно за оваа студија, аналитички методи што се користат за да се утврди присуство на контаминентите.

Целта на трудот е да се објасни валидирање на процесот на чистење, за отстранување на контаминенти од активната супстанција - Propafenone HCL на фармацевтска дозирана форма Propafenon tbl 150 mg од опремата за влажно гранулирање. Валидацијата на процесот на чистење се врши по производство на три последователни серии на производ што е одбран за најлош случај. За таа цел е користен специфичен HPLC метод за одредување на присуство на контаминенти од Propafenone HCL и добивање веродостојни резултати на присутни контаминенти кои се под дозволени граници од 10 ppm.

Производ кој преставува најлош случај за воден циклус е Propafenon tbl 150 mg за опремата за влажно гранулирање. Посебен предизвик за аналитичкиот метод е можност за детекција на контаминентите на многу ниско ниво затоа што осетливоста на аналитичкиот метод треба да е соодветен на пресметаните граници на контаминација. Методата е изведена на колона : RP Select B 250 x 4mm; 5 μ m., со мобилна фаза : A 41% (буфер кој е составен од 0.5 mg/L натриум хексан сулфонат и 1 ml/L оцетна киселина) : B 48% (метанол); C 11% (ацетонитрил). Протоколот е 1ml/min, волуменот на инјектирање е 20 μ l и брановата должина е 250 nm.

Од добиените резултати за валидација на аналитичкиот метод може да се заклучи дека добиените вредности за испитуваните параметри се вклопуваат во прифатливите критериуми за валидација на аналитичкиот метод со што предложениот и валидиран аналитички метод е соодветен за определување на контаминент од активната супстанција Propafenone HCL на Propafenone tbl 150 mg. По утврдување на соодветноста и валидацијата на аналитичкиот метод и пресметување на границите на дозволено присуство на контаминенти, се врши проверка на ефикасноста на процесот на чистење. Врз основа на добиените резултати кои се добиени по земањето на примероци откако е извршено чистењето на опремата на која се произведени три последователни серии на Propafenon tbl 150 mg, може да се процени дека валидацијата на процесот на чистење на опремата за влажно гранулирање е успешно завршена. Добиените вредности за резултатите со испитувањето на земените примероци од три последователни серии на цврсти фармацевтски дозирани форми како најлош случај и од места кои се најтешки за чистење, се под прифатливата граница за дозволена контаминација од 10 ppm, со што се потврдува дека процесот на чистење е сигурен и ефикасен за отстранување на контаминенти. Највисоката добиена вредност за утврдено присуство на контаминент изнесува 2,32 ppm, определен за воден циклус по чистење на производство на Propafenon tbl 150 mg, што е многу пониска вредност од дозволената граница од 10 ppm. Процесот на чистење на опремата е валидиран, што значи дека е обезбеден документиран доказ за ефикасно отстранување на контаминентите од опремата за производство на фармацевтски дозирани форми до прифатливи граници, што не влијаат врз безбедноста на пациентот.

РЕФЕРЕНЦИ

1. Fourmen G.L and V.Mullen, "Determining Cleaning Validation Acceptance Limits for Pharmaceutical Manufacturing Operations", Pharm. Technology 54-60 (April 1993).
2. LeBlanc D.A., "Sampling Analyzing and Removing Surface Residues Found in Pharmaceutical Manufacturing", Pharm Technology 84-92 (July 1993).
3. Gil Bizmuth and Sosh Neumen, "Cleaning Validation-a practical approach", Informa Healthcare USA (2007).
4. FDA, "Guide to inspections of Validation of Cleaning process", Washington (July 1993).
5. FDA, MID Atlantic region inspection guide, "Cleaning validation" (May 1993).

THE QUANTITATIVE STRUCTURE-RETENTION RELATIONSHIP (QSRR) ANALYSIS OF SOME CENTRALLY ACTING ANTIHYPERTENSIVES AND DIURETICS IN CYCLODEXTRIN-MEDIATED CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Slavica Filipic¹, Katarina Nikolic¹, Irena Vovk², Mitja Krizman³, Danica Agbaba¹

¹Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

²Centre of Excellence, National Institute of Chemistry, Ljubljana, Slovenia

³Laboratory of Food Chemistry, National Institute of Chemistry, Ljubljana, Slovenia

The migration behavior of eleven antihypertensive drugs was examined by capillary electrophoresis employing 30 mM phosphate background electrolyte (pH 2) with different concentrations of α , β and γ cyclodextrins.

The Quantitative Structure-Retention Relationship (QSRR) models of the inclusion complexes between the analyzed compounds (ligands) and α , β , and γ cyclodextrins (ACD, BCD, GCD) were performed to investigate correlations between electrophoresis migration order and the constitutional, geometrical, physico-chemical, and electronical properties of the molecular models.

The theoretical calculations were performed using the Gaussian 98 software package. The initial molecular geometries of α CD, β CD, γ CD, guest molecules and inclusion complexes were fully optimized using PM3 methods [1]. The corresponding frequencies were calculated to ensure that the obtained stationary points were true minima.

The ChemPro, Marvin 4.0.5 Chem Axon and CS Gaussian 98 [B3LYP/6-31G+(d, p), B3LYP/3-21G(d) and HF/3-21G(d) basis set] programs [2, 3] were applied for molecular parameters computation of the optimized ligands and ligand-ACD, ligand-BCD and ligand-GCD complexes.

Partial least square regression (PLSR) has been used for calculation of variable importance in the projection (VIP) and QSRR model development. For the regression analysis was employed Soft Independent Modeling of Class Analogy SIMCA P+ 12.0 program [4]. The quality of the regression models was estimated using parameters such as the square of correlation coefficient (R^2), root mean square error of estimation (RMSEE), root mean square error of prediction (RMSEP), Q^2 , F ratio and P values.

The developed QSRR models can help in understanding the structural features that contribute to the electrophoresis retention behavior of the investigated antihypertensives in presence of different types of cyclodextrins and can be used as a fast, easy and reliable tool for electrophoretic migration parameters prediction of other related antihypertensive drugs.

REFERENCES

1. M. Filipic, M. Sancho, E. Gasull, J. Pharm. Biomed. Anal. 48 (2008) 969-973.
2. E. Yang, X. Zhao, F. Hua, J. Hao, J. Mol. Struct.-Theochem. 712 (2004) 75-79.
3. A. A. Rafati, S. M. Hashemianzadeh, Z. B. Nojini, M. A. Safarpou, J. Mol. Liq. 135 (2007) 153-157.
4. Umetrics AB, Umeå, Sweden, SIMCA P+ Program, Version 12.0.0.o. May, 2008, www.umetrics.com

THE EFFECT OF PH OF THE MEDIUM ON DISSOLUTION OF OMEPRAZOL IN OMEZOL CPS.20mg

Dragana Kafedziska, Sonja Naumovska, Blagica Samarova Stoev, Hristina Babunovska

AD Alkaloid Skopje

Omeprazol (INN) is a proton pump inhibitor used in the treatment of peptic ulcer disease. Omeprazole is a racemate. It contains a tricoordinated sulfur in a pyramidal structure and therefore can exist in equal amounts of both S and R enantiomers. In the acidic conditions of the stomach, both are converted to achiral products, which reacts with a cystein group in H⁺/K⁺ ATP ase, thereby inhibiting the ability of the parietal cells to produce gastric acid.

This component is poorly soluble in water and labile in aqueous acidic environment.

As active component is incorporated in the acidorezistance pellets introduced into capsules in the product Omezol.

The method for determining the extent of release of active component in acidic medium (acidorezistance) and then in intestinal medium (dissolution) is performing with HPLC method. The column is octadecylsilil silica gel stacionar phase 250mmx4mm, i.d.5 μm, mobile phase is isocratic - acetonitrile:phosphate buffer(40:60), flow rate 1ml/min, detection on 280 nm, temperature of the column is ambient, injection volume 20μl.

FIRST STAGE (ACIDOREZISTANCE)

The acidorezistance is performing in acidic medium (NaCl, 37% HCl, aq. purif.) apparatus tip II, speed 100rpm for 2 h, temperature of medium 37 °C.

FINAL STAGE (DISSOLUTION)

After the prescribed time passed, 0.235M Na₂HPO₄ is added to achive pH=6.8 in which medium dissolution test is continuing under the same conditions for 30 minutes.

The aim of our work was to achive better results from the dissolution where because of insufficient alkalinity of the medium (dissolution test) and diluent which is used to prepare the sample and standard solutions the areas of standards and samples are decreased over time. In the course of the analysis, in order not to lead to desintegration of the omeprazol, by which we had been gaining results that were below the declared limits; we came to a conclusion that the medium where the dissolution test performs should have pH that ranges between alkaline limits (6.75 – 6.85); and during the preparation for the standards and the samples for dissolution test, the dissolved omeprazol should also occur in alkaline medium that we have obtained by adding 0.25M NaOH. In an alkaline medium the Omeprazol, as an active component is very stable so that the results for the dissolubility have also improved a lot, and they enter the limits of the specification prescribed by the manufacturer.

REFERENCES

1. Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals; John A. Adamovics
2. Quality assurance in Analytical chemistry; Werner Funk, Vera Dammann, Gerhild Donvert
3. Stability of drugs and Dosage forms; Sumie Yoshioka; Valentino J. Stella
4. Quality assurance in the analytical chemistry laboratory; D. Brynn Hibbert

ВЛИЈАНИЕТО НА PH НА МЕДИУМОТ НА РАСТВОРЛИВОСТА НА OMEPRAZOL ВО OMEZOL CPS.20mg

Драгана Кафеџиска, Соња Наумовска, Благица Самарова Стоев, Христина Бабуновска

AD Alkaloid Skopje

Омепразол-от е активна компонента од групата инхибитори на протонската пумпа кој главно се користи во терапијата на пептичен улкус. Од хемиски аспект омепразол-от е рацемат кој содржи трикоординатен сулфур во пирамидална структура така што постои во еднакви количини на S И R енантиомери. Во кисела средина во желудникот, двете форми се конвертираат во ахирални продукти кои што реагираат со цистеин-ската група во H⁺/K⁺ АТФ- азата, така што доаѓа до инхибирање на париеталните клетки да произведуваат HCl.

Исто така оваа супстанца е слабо растворлива во вода и мошне нестабилна во водено-кисела средина.

Како активна компонента Омепразолот е инкорпориран во вид на ацидореизистентни пелети внесени во капсули во препаратот Оmezol. Одредувањето на параметарот ослободување на активната компонента во кисел медиум (ацидореизистентност) и потоа во интестинален медиум (растворливост) на Оmezol капсули се изведува со HPLC метода. Колоната е octadecylsilil silica gel (250mmx4mm, i.d.5μm), мобилна фаза: ацетонитрил: фосфатен пуфер(40:60), проток 1ml/min., детекција на 280nm, температурата на колоната е собна, волумен на инјектирање 20μl.

ПРВО НИВО(АЦИДОРЕЗИСТЕНТНОСТ)

Ацидореизистентноста се изведува во кисел медиум (NaCl, 37% HCl, aq. purif.), апарат тип II, брзина 100rpm, време: 2 часа, температура на медиум 37°C

КРАЈНО НИВО(РАСТВОРЛИВОСТ)

По истекот на пропишаното време, 0.235 M Na₂HPO₄ се додава за да се постигне pH=6.8 во кој што медиум се продолжува со тестот на растворливост уште 30 мин под истите услови.

Целта на нашето истражување беше да постигнеме подобри резултати при испитувањето на параметарот растворливост каде што поради недоволна алкална средина на медиумот за растворливост и на растворите кои се користат за подготовка на примероците и стандардот; доаѓаше до намалување на површините и во пробите и во стандардите со текот на времето

За да во текот на анализата на растворливоста не доаѓа до распаѓање на омепразолот со што добивавме резултати кои беа под пропишаните граници; дојдовме до заклучок дека медиумот во кој се одвива растворливоста треба да има pH кое се движи во алкални граници(6.75-6.85); при подготовка на стандардот и пробите за растворливост, растворениот омепразол треба да се наоѓа исто така во алкална средина што ја постигнавме со додавање на 0.25M NaOH. Во алкална средина Омепразолот како активна компонента е многу стабилен, при што и резултатите за растворливоста многу се подобрија, и влегуваа во границите од спецификацијата пропишана од производителот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals; John A. Adamovics
2. Quality Assurance in Analytical Chemistry; Werner Funk, Vera Dammann, Gerhild Donnevert
3. Stability of drugs and Dosage forms; Sumie Yoshioka; Valentino J. Stella
4. Quality assurance in the analytical Chemistry laboratory; D. Brynn Hibbert

QUALITY OF GLASS SURFACES CLEANING PRODUCTS

Olga Ortakova, Agim Ameti, Maja Shishovska, Dejan Stefanovski, Katerina Starkoska

Institute for Public Health of the Republic of Macedonia, Department for Quality Control of Medicines, 50 Divizija No 6, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

The quality control of the glass surfaces cleaning products was performed by determination of the compounds that are declared on the original packing and by testing the compliance with the quality specification provided by the manufacturer.

In the most cases these products are aquatic solutions of organic solvents, surfactants, color and perfume. The organic solvents that are usually present are: ethanol, methanol and isopropanol.

Gravimetric method is used for determination of the surfactants, while gas chromatography method is used for identification and quantification of the organic solvents.

GC method for separation and determination of organic solvents has been developed and validated following ICH recommendations (1, 2). Shimadzu GC-2010 Plus Instrument with FID (Flame-ionization detector) was used. The optimum separation of organic solvents was achieved using Agilent column DB-5MS (60 m x 0.32 i. d., 0.5 mm), injector port temperature at 225°C, detector temperature at 250°C and following oven temperature program: 40°C (5 min), 5°C/min to 100°C (10 min).

Statistical analysis of the validation data proved that the method is precise, reproducible, sensitive, specific and accurate. The linearity, sensitivity, accuracy, short retention times, resolution of components and chromatographic peak shapes imply that this method is suitable for routine analysis with high precision and accuracy and it can find application in routine determination of solvents present in glass surfaces cleaners.

The report of all glass surfaces cleaning products supplied and inspected by the State Sanitary Health and Inspection Service for the previous year period is given.

The 40 % of the samples analyzed are domestic products, 20 % are products imported from the EU countries and 33 % are from non-EU countries. On the base of the results obtained, 13.3 % from the samples analyzed do not comply with the declared composition, while 26.6 % of them do not have data for the content of the analyzed compounds.

REFERENCES

1. ICH Topic Q2(R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Version 4, 2005.
2. ICH Topic, Part II. Validation of Analytical procedures: Methodology, 2005.

КВАЛИТЕТ НА ПРОИЗВОДИ НАМЕНЕТИ ЗА ЧИСТЕЊЕ НА СТАКЛЕНИ ПОВРШНИ

Олга Ортакова, Агим Амети, Маја Шишовска, Дејан Стефановски, Катерина Старкоска

Институт за јавно здравје на Република Македонија, Сектор за испитување и контрола на лекови, 50 Дивизија бр. 6, 1000 Скопје, Република Македонија

Контрола на квалитетот на производи наменети за чистење на стаклени површини, меѓу другите испитувања, се изведува и со проверка на декларираниот состав и спецификацијата за квалитет на производот наведени од страна на производителот на оригиналната пакување.

Во најголем број случаи, овие производи претставуваат водени раствори на органски растворувачи, површинско активни материји, боја и парфем. Од органските растворувачи, најчесто се присутни: етанол, метанол и изопропанол.

За определување на содржина на површинско активни материји се користи гравиметриски метод, додека пак за идентификација и квантификација на органските растворувачи се користи гасна хроматографија.

ГС методот за одвојување и определување на органските растворувачи е развиен и валидиран според ICH препораките (1, 2). Користен е инструментот Shimadzu GC-2010 Plus со FID детектор. Оптималното одвојување на органските растворувачи е постигнато на колона Agilent DB-5MS (60 m x 0.32 i.d., 0.5 mm), температура на инјектор на 225°C, температура на детектор на 250°C и со следниот температурен програм на колоната: 40°C (5 min), 5°C/min до 100°C (10 min).

Статистичката анализа на податоците добиени при валидацијата докажува дека методот е прецизен, репродукцибилен, осетлив, специфичен и точен. Линеарноста, осетливоста, точноста, кусите ретенциони времиња, резолуцијата на компонентите и обликот на хроматографските пикови укажуваат дека овој метод е соодветен за рутинска анализа со голема прецизност и точност и може да најде примена во определување на растворувачи присутни во производи за чистење на стаклени површини.

Направен е преглед на производи за чистење на стаклени површини и ветробрански стакла доставени на анализа од страна на ДСЗИ (Државен Санитарен и Здравствен Инспекторат) во период од една година. Од испитаните примероци 40% се од домашно производство, 20% потекнуваат од земји - членки на ЕУ, а 33% од земји која не се членки на ЕУ. Врз основа на добиените резултати утврдено е дека 13,3% од испитаните примероци не одговараат на декларираниот состав на производителот, 33,3% имаат непотполн декларираниот состав, додека 26,6% не поседуваат податоци за состојките на производот употребени за негово производство.

ЛИТЕРАТУРА

1. ICH Topic Q2(R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Version 4, 2005.
2. ICH Topic, Part II. Validation of Analytical procedures: Methodology, 2005.

DETERMINATION OF FERULIC ACID WITH RP-HPLC METHOD IN ORAL SOLUTION CONTAINING EXTRACT OF FERULA ASSAFOETIDA L. AND VISCUM ALBUM L.

Jasmina Slavkovska, Maja Shishovska, Dragica Doneva, Zorica Arsova –Sarafinovska, Katerina Starkoska

Institute for Public Health of the Republic of Macedonia, Department for Quality Control of Medicines, Skopje, Republic of Macedonia

Ferula assafoetida L. is a medicinal plant widely used in the traditional medicine. Roots of *Asafoetida*, produces natural antiviral drug compounds that kill the swine flu virus, H1N1.¹ The aim of this study was to develop and validate a RP-HPLC method for quality control of commercially available oral solution containing extract of *Ferula assafoetida* L. and *Viscum album* L.,

Determination of the content of *Ferula assafoetida* L. extract in the oral solution was made by determination of ferulic acid, one of components identified in *Ferula assafoetida* L. plant.

The chromatographic separation was achieved on a reversed-phase column Purospher STAR[®] RP -18e (150 x 4.6 mm i.d., particle size 5µm), gradient run (using acetonitrile and 0.01 mol L⁻¹ orthophosphoric acid as a mobile phase), at 25°C temperature. The flow rate was kept at 1.5 ml min⁻¹. Detection of ferulic acid was carried out at 316 nm using photodiode array detector. The proposed method was fully validated according to the ICH guidelines in terms of accuracy, precision, linearity and range.²⁻⁴ The obtained data for precision, (RSD of 9.69%), and accuracy (recovery of 104.39%) are suitable for this kind of analysis. The linearity of the proposed method was tested in the range of 0.1 – 1.8 µg mL⁻¹ with regression coefficient of 0.9995 obtained. These validation results demonstrate the suitability of the method for quality control of this oral solution with expected content of ferulic acid of about 0.0001%, m/m (1ppm).

This developed HPLC method was proven to be precise, specific, sensitive, and accurate for routine quality assessment of raw material plant *Ferula assafoetida* L., its extract, and pharmaceutical products.

REFERENCES:

1. Lee,CL; Chia-Lin Lee, Lien-Chai Chiang, Li-Hung Cheng, Chih-Chuang Liaw, Mohamed H. Abd El-Razek, Fang-Rong Chang, Yang-Chang Wu (August 19,2009(Web)). "Influenza A (H1N1) Antiviral and Cytotoxic Agents from *Ferula Assafoetida*". Journal of Natural Products xxx(xx):1568-72. doi: 10.1021/np900158f (http://dx.doi.org/10.1021/np900158f). PMID 19691312 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19691312)
2. ICH Q2R1: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Proceeding of the International Conference on Harmonisation of technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 1996
3. 9. AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, Va., USA (1998) http://www.aoac.org/vmeth/PVM.pdf
4. G.C. Hokanson, a cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, part I: The initial validation process, Pharm. Tech., Sept. 1994, pp. 118-130.

ОДРЕДУВАЊЕ НА ФЕРУЛНА КИСЕЛИНА СО RP-HPLC МЕТОД ВО ПЕРОРАЛЕН РАСТВОР КОЈ СОДРЖИ ЕКСТРАКТ ОД FERULA ASSAFOETIDA L. И VISCUM ALBUM L.

Јасмина Славковска, Маја Шишовска, Драгица Донева, Зорица Арсова –Сарафиновска, Катерина Старкоска

ЈЗУ Институт за јавно здравје на Република Македонија, Сектор за испитување и контрола и на лекови, 50 Дивизија Бр. 6, 1000 Скопје, Република Македонија

Ferula assafoetida L. е билка која има широка примена во традиционалната медицина. Коренот на *Asafoetida*, содржи компоненти кои имаат антивирално дејство, кои делуваат и на вирусот на свинскиот грип, H1N1.¹ Цел на ова истражување беше да се развие и валидира RP-HPLC метод за рутинска контрола на квалитет на перорален раствор кој содржи екстракт од *Ferula assafoetida* L. и *Viscum album* L., достапен на пазарот во Република Македонија.

Одредување на содржината на екстрактот од *Ferula assafoetida* L. во пероралниот раствор беше изведено преку одредување на содржината на ферулна киселина, една од компонентите идентификувани во билката *Ferula assafoetida* L.. Хроматографска сепарација беше постигната на реверзно – фазна колона Purospher STAR[®] RP -18e (150 x 4,6 mm i.d., со големина на честички 5µm), работено со градиент (користејќи ацетонитрил и 0,01М ортофосфорна киселина, како мобилна фаза), на температура од 25 °C, со проток 1,5 ml min⁻¹. Детекцијата на ферулната киселина беше изведена на 316 nm. Предложениот метод беше комплетно валидиран согласно ICH водичите во однос на точност, прецизност, линеарност и опсег.²⁻⁴ Добиените резултати за прецизноста (RSD 9,69%), и точноста (аналитички принос од 104,39%) одговараат на овој вид анализа. Линеарноста на предложениот метод беше тестирана во опсег од 0,1 – 1,8 µg mL⁻¹ со коефициент на корелација 0,9995. Резултатите добиени при валидацијата на методот потврдуваат дека предложениот метод е соодветен за контрола на квалитет на перорален раствор кој содржи ферулна киселина околу 0,0001%, m/m (1ppm).

Развиениот HPLC метод е прецизен, специфичен, осетлив и точен, а со тоа и соодветен за рутинска контрола на квалитет на билката *Ferula assafoetida* L., екстрактот и фармацевтски производи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee,CL; Chia-Lin Lee, Lien-Chai Chiang, Li-Hung Cheng, Chih-Chuang Liaw, Mohamed H. Abd El-Razek, Fang-Rong Chang, Yang-Chang Wu (August 19,2009(Web)). "Influenza A (H1N1) Antiviral and Cytotoxic Agents from *Ferula Assafoetida*". Journal of Natural Products xxx(xx):1568-72. doi: 10.1021/np900158f (http://dx.doi.org/10.1021/np900158f). PMID 19691312 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19691312)
2. ICH Q2R1: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Proceeding of the International Conference on Harmonisation of technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 1996
3. 9. AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, Va., USA (1998) http://www.aoac.org/vmeth/PVM.pdf
4. G.C. Hokanson, a cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, part I: The initial validation process, Pharm. Tech., Sept. 1994, pp. 118-130.

SALTING-OUT EFFECTS IN THE ETHER EXTRACTION OF PARACETAMOL

G.M. Nikolić, J.V. Živković, A.M. Veselinović, D. Atanasković, D. Vlajin

University of Niš, Faculty of Medicine, Department of Chemistry,
Bulevar dr Zorana Đinđića 81, 18000 Niš, Serbia

INTRODUCTION

Paracetamol (acetaminophen, N-acetyl-*p*-aminophenol) is one of the most widely used analgesic and antipyretic drugs. Since misuse of paracetamol may lead to serious toxic effects (eg. hepatic necrosis) its determination in various samples is of great importance (1).

Numerous methods for paracetamol determination include the liquid-liquid extraction step during the sample preparation for the analysis and diethyl ether is often used for such purpose (2). However, as in the case of some other phenolic compounds paracetamol is poorly extracted with ethers and one way to overcome this problem is salting-out (3).

The aim of this work was to study salting-out effects in the extraction of paracetamol with diethyl and diisopropyl ether from aqueous solutions containing inorganic salts.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

All the chemicals used in this study were of analytical grade purity and have been used without further purification. Stock solutions of paracetamol (0.01 mol dm⁻³) and inorganic salts were prepared by dissolving exactly weighted mass of pure substances in doubly distilled water and 0.01 mol dm⁻³ solution of HCl was added to adjust the pH value of paracetamol solution to -2. Just before each series of extractions stock solution of paracetamol was diluted 100 times with doubly distilled water or aqueous salt solutions. Extraction was performed by the shake-flask method for each aqueous phase composition in triplicate.

MEASUREMENTS AND CALCULATIONS

Evolution 60 UV/Vis scanning spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) was used for absorbance measurements. The absorbance of aqueous phases were measured at 243 nm and the distribution ratio (D) of paracetamol was calculated by using the equation

$$D = \frac{A_0 - A}{A} \times \frac{V_{aq}}{V_{org}}$$

where A₀ and A were absorbances of the aqueous phases before and after extraction, and V_{aq} and V_{org} were the volumes of aqueous and organic phase, respectively.

Salting-out effect in the extraction of paracetamol was quantified by calculating the salting coefficient, k_s, according to the equation analogous to that given by Setschenow (4)

$$\log(D/D_0) = k_s C_s$$

where D₀ and D represented distribution ratios obtained in the extraction of paracetamol from pure aqueous solution and solution containing inorganic salt, respectively, and C_s was the concentration of salt in solution.

RESULTS AND DISCUSSION

The dependence of log(D/D₀) on the salt concentration for the paracetamol extraction by diethyl ether is shown in Fig.1.

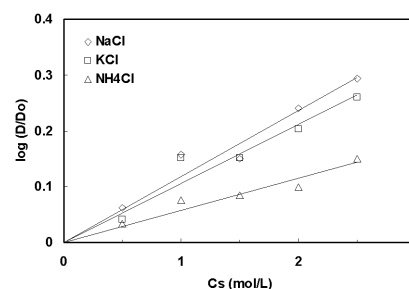


Fig. 1: Dependence of log(D/D₀) on the salt concentration in the aqueous solution for the paracetamol extraction by diethyl ether.

The values of salting-out constants for the extraction of paracetamol with diethyl and diisopropyl ether from aqueous solutions of salts investigated in this study are given in Table. 1.

Table 1. Salting-out constants for the extraction of paracetamol with diethyl and diisopropyl ether from aqueous salt solutions.

Salt	Salting-out constant	
	Diethyl ether	Diisopropyl ether
NaCl	0.118	0.162
KCl	0.106	0.127
NH ₄ Cl	0.058	0.080

For both ethers used in this study we found that salting-out constants for the paracetamol extraction decreased in the order

$$k_s(\text{NaCl}) > k_s(\text{KCl}) > k_s(\text{NH}_4\text{Cl})$$

the same order which was found for the extraction of catechol with diethyl ether (4) and extraction of 1-naphtol with carbon tetrachloride (5). Although salting-out constant for a particular substance/salt combination is expected to be independent of the organic solvent applied for the extraction we obtained higher values for all three salts investigated in the case of diisopropyl ether. Some variability of k_s(NaCl) values was also observed for the 1-naphtol when different organic solvents have been used for the extraction (5). In our case possible reason for higher k_s values in the case of diisopropyl ether may be that it is much less soluble in water than diethyl ether. When comparing k_s(NaCl) values for different substances the value for paracetamol obtained in this study was much lower than the value for 1-naphtol (between 0.195 and 0.218 for four different organic solvents) probably because of the more polar nature of paracetamol.

Our results indicated that salts investigated in this study exhibited significant effect on the extraction efficiency of paracetamol with ethers which could be used for improving sensitivity of analytical methods using liquid-liquid extraction for sample treatment as in the case of catechol and hydroquinone (3). Also these results may be used for better understanding of salting-out phenomenon and its dependence on the chemical structure of various substances.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia under the Project No. 172044.

REFERENCES

1. Espinosa Bosch M, Ruiz Sánchez AJ, Sánchez Rojas F, Bosch Ojeda C, Determination of paracetamol: Historical evolution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006; 42: 291-321.
2. Li H, Zhang C, Wang J, Jiang Y, Paul Fawcett J, Gu J, Simultaneous quantitation of paracetamol, caffeine, pseudoephedrine, chlorpheniramine and cloperastine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010; 51: 716-722.
3. Nikolić GM, Perović JM, Nikolić RS, Cakić MM, Salting-out extraction of catechol and hydroquinone from aqueous solutions and urine samples. *Facta Universitatis Ser. Pys. Chem. Techn.* 2003; 2: 293-299.
3. Nikolić GM, Nikolić RS, Perović JM, Determination of Setschenow salting-out constants of catechol by liquid-liquid extraction. *Proceedings of the 7th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry (Belgrade 2004)* 841-843.
4. Balon Almeida M, Maestre Alvarez A, Muñoz de Miguel E, Soria del Hoyo E. Setchenow coefficients for naphthols by distribution method. *Can J Chem* 1983; 61: 244-248.

SALIVA AS AN ALTERNATIVE MATRIX FOR TDM OF AEDS: HPLC DETERMINATION OF CARBAMAZEPINE AND VALPROIC ACID IN SALIVA OF EPILEPTIC PATIENTS

J.Tonic-Ribarska¹, Z.Sterjev¹, A.Haxhiu¹, G.Kiteva², E.Cvetkovska², I.Petrov², I.Kuzmanovski², N.Baneva², A.Arsovska², N.Tanovska², Lj.Suturkova¹, S.Trajkovic-Jolevska¹

¹Faculty of Pharmacy, University "Ss Cyril and Methodius", Skopje, Macedonia

²Clinic of Neurology, Faculty of Medicine, University "Ss Cyril and Methodius", Skopje, Macedonia

INTRODUCTION

During the last several years there has been a great interest in the use of saliva as an alternative body fluid for the TDM of AEDs. Not only saliva can be obtained easily with minimal discomfort to the patient, but more importantly, salivary AED concentrations are assumed to reflect their free levels in tissue and therefore may have greater clinical relevance than measurements of AED concentrations in serum/plasma (1). Carbamazepine and valproic acid, in view of their broad therapeutic spectrum and proven efficacy, are important and commonly used drugs in the treatment of epilepsy (2, 3).

The purpose of this study was to establish the reliable SPE-HPLC methods for the determination of CBZ and VPA in saliva samples obtained from the epileptic patients undergoing chronic CBZ and VPA therapy, in order to investigate the possibility to use saliva as an alternative matrix for TDM of these AEDs.

MATERIALS AND METHODS

CHEMICALS AND REAGENTS

CBZ, nitrazepam (IS), valproic acid sodium salt and octanoic acid (IS) were purchased from Sigma-Aldrich, USA. Methanol and acetonitrile (HPLC grade), potassium dihydrogen phosphate and phosphoric acid (analytical grade) were obtained from Merck, Germany. For all analysis,

HPLC grade water was used. OASIS HLB cartridges and SampliQ OPT cartridges used for sample preparation were supplied by Waters, USA and Agilent Technologies, USA, respectively.

SALIVA SAMPLES

Saliva was collected from healthy volunteers and from the epileptic patients under oral chronic CBZ and VPA therapy. The principles embodied in the Helsinki Declaration were adhered to and the Ethics Committee at the Faculty of Pharmacy and the Faculty of Medicine, Ss.Cyril and Methodius University – Skopje, approved the research protocol for this study.

The extraction of the analytes from saliva samples was performed by means of a solid-phase extraction (SPE) procedure using OASIS HLB cartridges for CBZ and SampliQ OPT cartridges for VPA determination.

CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS

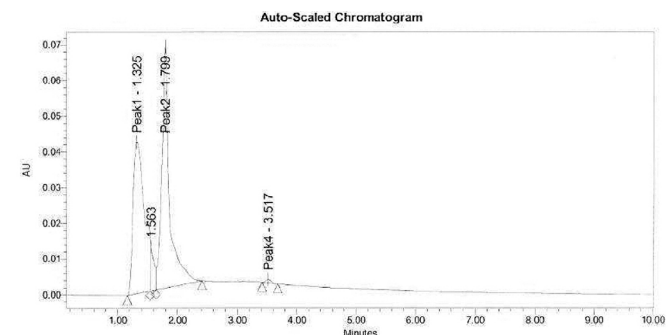
The separations were performed on Agilent 1100 HPLC system with: - CBZ: Zorbax Extend C18 column using isocratic elution with AcN and water (35:65, v/v) as a mobile phase. The temperature was 30°C and UV detection was set at 220 nm.

- VPA: Zorbax Eclipse XDB column with a mobile phase of AcN - phosphate buffer (pH 3.0; 0.02M) (40:60, v/v). Detection was made at 210 nm.

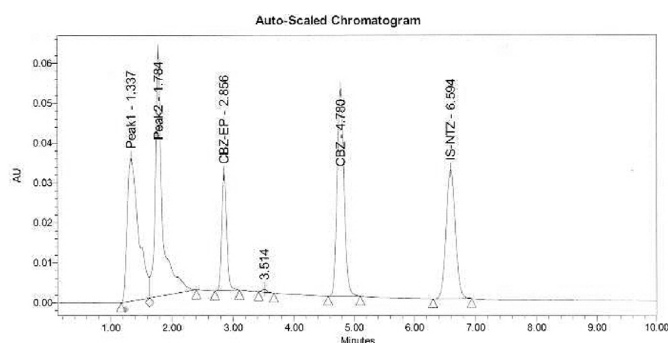
Validation of the methods was developed following the recommendations for validation of bioanalytical methods of EMA guideline (4).

RESULTS AND DISCUSSION

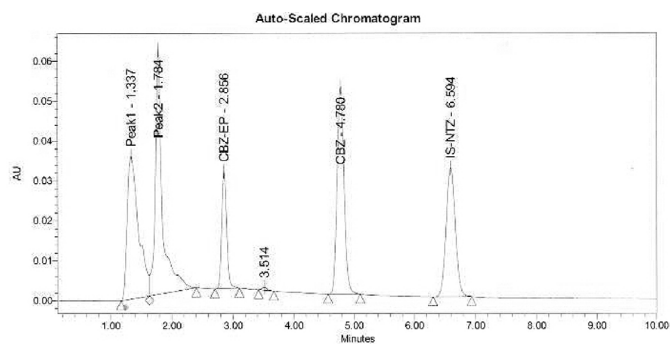
The extraction yield values were in the range of 98,3%-99,2% for CBZ and 96,8%-99,4% for VPA measured at four concentration levels of the linear concentration range. Under the proposed chromatographic conditions, no interfering peaks were observed in the retention times of analytes.



a)

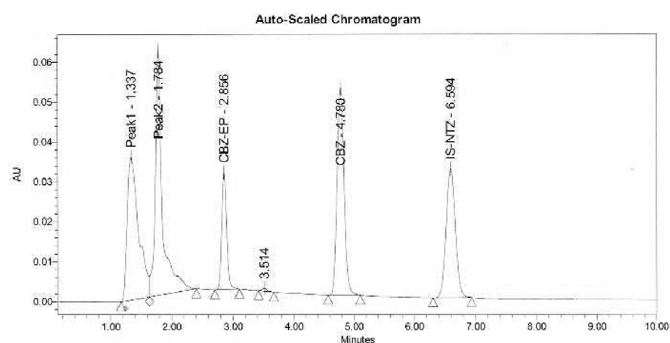


b)

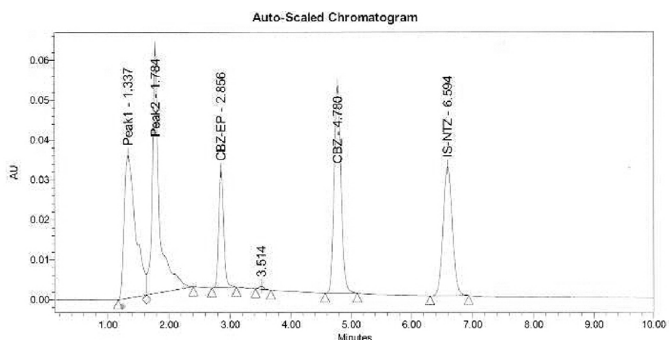


c)

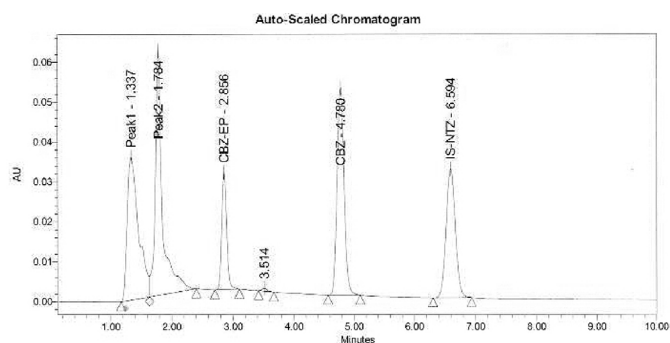
Fig. 1: RP-HPLC chromatograms obtained from (a) blank saliva; (b) blank saliva spiked with CBZ (2.5µg/ml), CBZ-EP (1.25µg/ml) and nitrzapam (1µg/ml) and (c) saliva sample from a patient treated with 600mg/day of CBZ, taken 10h after the last oral administration



a)



6)



c)

Fig.2. RP-HPLC chromatograms obtained from (a) blank saliva; (b) blank

saliva spiked with valproic acid (50µg/ml) and octanoic acid (36.2µg/ml) and (c) saliva sample from a patient treated with 800 mg/day of valproic acid, collected 2 h after the last drug intake

Both methods displayed excellent selectivity, sensitivity, linearity, precision and accuracy. Stability studies indicate that stock solutions and saliva samples were stable under different storage conditions at least during the observed period (1 month).

The proposed methods give satisfactory results when were applied to saliva samples collected from epileptic patients (currently 20 patients have been enrolled in this study, 10 with CBZ and 10 with VPA) with carbamazepine and valproate therapy (Fig 1c and Fig 2c).

CONCLUSIONS

Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs in saliva can be useful in paediatric, geriatric and patients with disabilities, for analyzing the concentration of free drug (pharmacologically active fraction, especially when a change in protein binding is suspected) and in situations where multiple repeated sampling is necessary. From technical point of view, saliva collection is noninvasive, painless, simpler, less stress, and complications of infection and thrombosis are avoided.

The proposed methods were successfully applied to separate and determine the CBZ and VPA in saliva samples obtained from epileptic patients. The obtained results in this group of patients were encouraging, however further studies are required to assess whether salivary concentration of AEDs may serve as a viable alternative to plasma concentration monitoring in routine clinical practice.

REFERENCES

1. AlZaabi M. et al, Salivary free concentrations of AEDs: an evaluation in a routine clinical setting. Acta neurol. Belg. 2003; 103; 19-23
2. Maldonado C., et al, Therapeutic carbamazepine and valproic acid monitoring in children using saliva as a biologic fluid. J. Epilepsy. Clin. Neurophysiol. 2008;14:55-58
3. Shorvon S., Perruca E. and Engel J., The treatment of epilepsy, third Ed., 2009, Wiley-Blackwell, Oxford, UK
4. Guideline on validation of bioanalytical methods, European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2009

ПЛУНКА КАКО АЛТЕРНАТИВЕН МАТРИКС ЗА ТЕРАПЕВТСКО СЛЕДЕЊЕ НА АНТИЕПИЛЕПТИЧНИ ЛЕКОВИ: HPLC ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КАРБАМАЗЕПИН И ВАЛПРОИНСКА КИСелиНА ВО ПЛУНКА ОД ПАЦИЕНТИ БОЛНИ ОД ЕПИЛЕПСИЈА

Ј.Тониќ-Рибарска¹, З.Стерјев¹, А.Хаџиу¹, Г.Китева², Е.Цветковска², И.Петров², И.Кузмановски², Н.Банева², А.Арсовска², Н.Тановска², Љ.Шутуркова¹, С.Трајковиќ-Јолевска¹

¹Фармацевтски факултет, Универзитет "Св.Кирил и Методиј", Скопје, Македонија

²Клиника за неврологија, Медицински факултет, Универзитет "Св.Кирил и Методиј", Скопје, Македонија

ВОВЕД

Во текот на последните неколку години зголемен е интересот за употреба на плунка како алтернативен матрикс за терапевтско следење на антиепилептичните лекови. Примероците од плунка се земаат едноставно, без нелагодност за пациентите, и најбитно, се претпоставува дека концентрацијата на АЕЛ во плунка ја претставува слободната фракција на овие лекови во ткивата и поради тоа може да има поголема клиничка важност отколку определувањето на концентрацијата на АЕЛ во плазма/серум (1). Карбамазепинот и валпроинската киселина, со оглед на терапевтскиот спектар и докажаната ефикасност, се значајни и најчесто употребувани лекови во третман на епилепсија (2,3). Целта на ова испитување е да се воспостават сигурни SPE-HPLC методи за определување на CBZ и VPA во плунка добиена од епилептични пациенти на хронична терапија со CBZ и VPA, со цел да се испита можноста за користење на плунка како алтернативен матрикс за терапевтско следење на испитуваните антиепилептични лекови.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ СУПСТАНЦИИ И РЕАГЕНСИ

Карбамазепин, нитразепам (IS), натриум валпроат и октанонска киселина (IS), Sigma-Aldrich, USA. Метанол, ацетонитрил, KH_2PO_4 и фосфорна киселина, Merck, Германија. За сите анализи е користена вода со HPLC чистота. OASIS HLB и SampliQ OPT колонки за подготовка на примероците се добиени од Waters, USA и Agilent Technologies, USA.

ПОДГОТОВКА НА ПРИМЕРОЦИ ОД ПЛУНКА

Примероците од плунка се земени од здрави доброволци и од епилептични пациенти под хронична орална терапија со CBZ и VPA. Добиените примероци се замрзнуваат на -20°C . Во оваа студија почитувани се принципите наведени во Хелсиншката декларација и протоколот за истражување е одобрен од Етичкиот комитет при Фармацевтскиот факултет и Медицинскиот факултет во Скопје. Подготовката на примероците од плунка е изведена со употреба на цврсто-фазна екстракција (SPE). За екстракција на CBZ од плунка употребувани се OASIS HLB колонки, а екстракцијата на VPA е изведена на SampliQ OPT колонки.

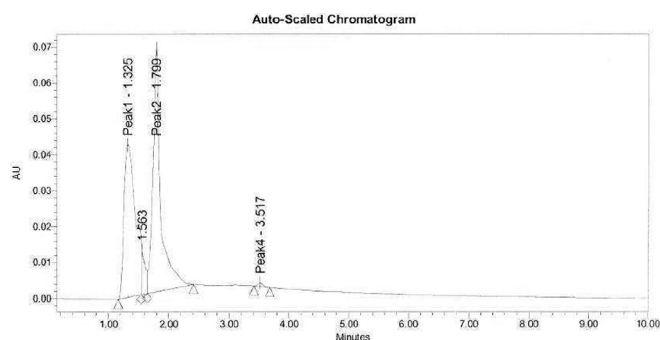
ХРОМАТОГРАФСКИ УСЛОВИ

Испитувањата се изведени на Agilent 1100 HPLC систем: **CBZ**: Zorbax Extend C18 колона со изократско елуирање со AcN и вода (35:65 v/v) како мобилна фаза; температура на колона 30°C ; UV детекција на 220 nm. **VPA**: Zorbax Eclipse XDB колона; изократско елуирање на собна температура со мобилна фаза AcN – фосфатен пуфер (pH 3.0; 0.02M) (40:60, v/v); детекција на 210 nm.

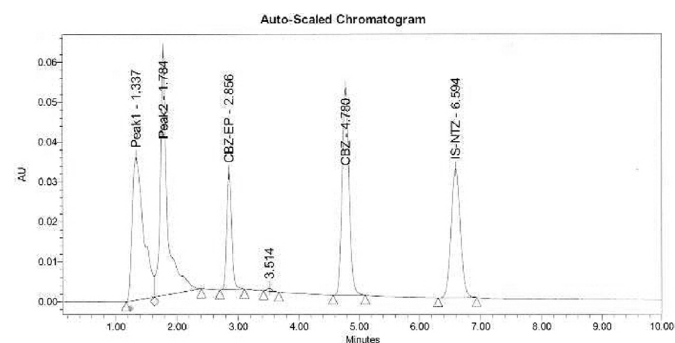
Методите се валидирани во согласност со водичот за валидација на биоаналитички методи предложен од EMA (4).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

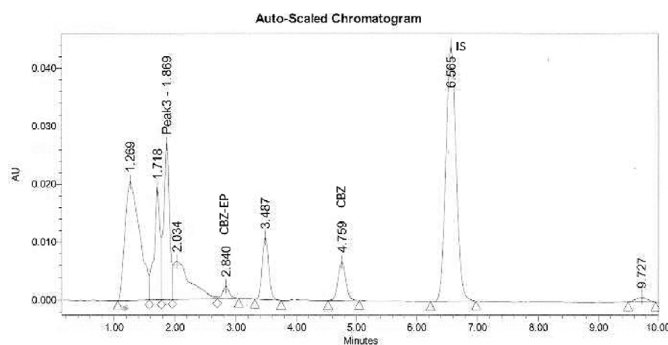
Добиените вредности за екстракција определени на четири концентрациски нивоа од линеарниот концентрациски опсег, изнесуваат 98,3%-99,2% за CBZ и 96,8%-99,4% за VPA. Со примена на утврдените хроматографски услови добиено е комплетно разделување на аналитите од интерферирачките супстанции.



a)

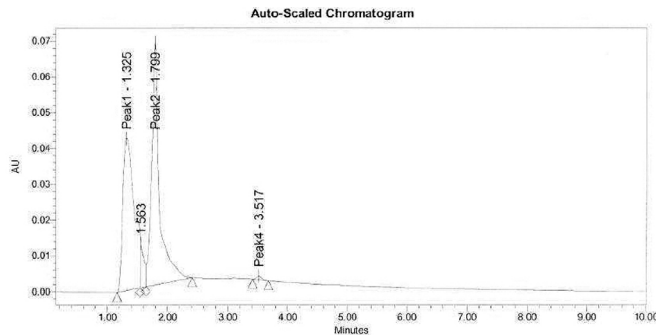


b)

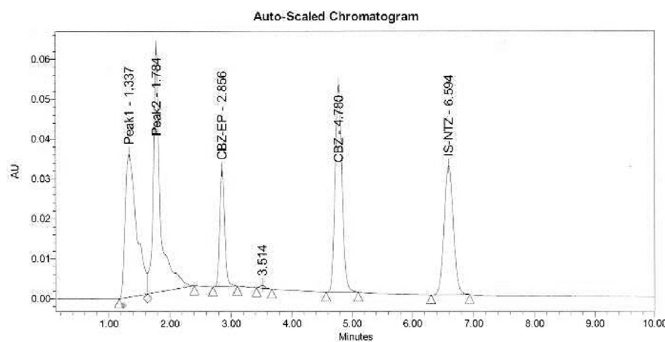


c)

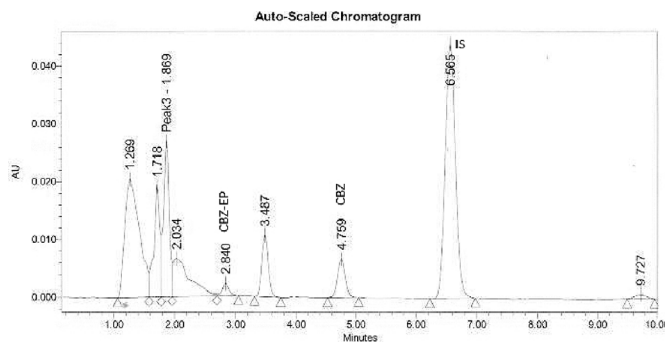
Слика. 1: RP-HPLC хроматограми (а) слепа плунка; (б) слепа плунка спајкувана со CBZ (2.5µg/ml), CBZ-EP (1.25µg/ml) и NTZ (1µg/ml) и (с) плунка од пациент третиран со CBZ 600mg/ден земена 10h после последната орална доза



a)



b)



c)

Слика.2: RP-HPLC хроматограми (а) слепа плунка; (б) слепа плунка спајкувана со VPA (50µg /mL) и OA (36.2µg /mL) и (с) плунка од пациент третиран со VPA 800mg/ден земена 2h после последната орална доза

Двете методи имаат одлична селективност, осетливост, линеарност, прецизност и точност. Студиите на стабилност укажуваат дека стандардните раствори и примероците од плунка се стабилни на различни услови на чување во период од 1 месец. Со примена на воспоставените методи за анализа добиени се задоволителни резултати на примероци од плунка земено од епилептични пациенти под терапија со CBZ и VPA (испитувањата се изведени на 20 пациенти, 10 со CBZ (слика 1c), 10 со VPA) (слика 2c).

ЗАКЛУЧОК

Терапевтското следење на антиепилептичните лекови во плунка може да биде особено корисно за деца, стари лица и пациенти со посебни потреби, за анализа на концентрацијата на слободен лек (неврзан за протеини, фармаколошки активен), како и во услови на повеќекратна анализа. Од технички аспект, земањето на примероци од плунка е неинвазивно, безболно, едноставно, и се избегнуваат компликации од инфекции и тромбоза. Воспоставените методи се успешно применети за разделување и определување на CBZ и VPA во плунка добиена од епилептични пациенти. Добиените резултати од испитуваната група на пациенти се охрабрувачки. Сепак, потребни се дополнителни испитувања за да се процени дали концентрацијата на АЕЛ во плунка може да биде соодветна алтернатива за следење на плазматската концентрација во рутинската клиничка пракса.

РЕФЕРЕНЦИ

1. AlZaabi M. et al, Salivary free concentrations of AEDs: an evaluation in a routine clinical setting. Acta neurol. Belg. 2003; 103; 19-23
2. Maldonado C., et al, Therapeutic carbamazepine and valproic acid monitoring in children using saliva as a biologic fluid. J. Epilepsy. Clin. Neurophysiol. 2008;14:55-58
3. Shorvon S., Perruca E. and Engel J., The treatment of epilepsy, third Ed., 2009, Wiley-Blackwell, Oxford, UK
4. Guideline on validation of bioanalytical methods, European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2009

OPTIMIZATION OF MELC ANALYSIS OF PRAMIPEXOLE AND ITS IMPURITIES

A. Malenović, A. Vemić, N. Kostić, T. Rakić, B. Jančić-Stojanović

University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis, Belgrade, Serbia

In this paper, the desirability-based optimization of microemulsion liquid chromatographic (MELC) method intended for the determination of pramipexole and its five impurities (BI-II 751 xx, BI-II 546 CL, BI-II 820 BS, 2-aminobenzothiazole and BI-II 786 BS) is presented. Desirability function approach proved to be a useful statistical tool to solve multi-variable problems and optimize one or several responses. The method finds operating conditions that provide the "most desirable" response values.

During the preliminary study, contents of butylacetate, sodium dodecyl sulphate/Brij 35®, *n*-butanol and triethylamine were selected as factors to be varied. As outputs, retention factor k for the last eluting peak of impurity BI-II 786 BS ($k_{BI-II\ 786\ BS}$) and separation criterion S for the critical pair pramipexole/2-aminobenzo-thiazole ($S_{P/2-ABT}$) were chosen. Separation criterion is defined as the difference between the retention time at the beginning (t_D) of the second peak and the retention time at the end (t_E) of the first peak of the critical pair [1]. The lowest acceptable value of S is 0 corresponding to base line separation of the observed peaks. So, any value higher than 0 might be rated as acceptable.

All other factors (column: Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 4.6 x 100 mm, 5 µm particle size; flow rate: 1 ml min⁻¹; pH of the mobile phase adjusted to 7.0 with orthophosphoric acid; wavelength 262 nm for pramipexole, BI-II 751 xx, 2-ABT, BI-II 786 BS, and BI-II 820 BS, and 326 nm for BI-II 546 CL, were kept on defined levels. Chromatographic separation was done on the chromatographic system Waters Breeze consisted of Waters 1525 Binary HPLC Pump, Waters 2487 UV/VIS detector and

Breeze Software, Windows XP, for data collection.

As the starting point, the plan of experiments was defined by full factorial 2^4 design with four replications in the central point. Accordingly, the set of microemulsion eluents of the varying compositions was prepared. The statistical evaluation of obtained data was performed by Design-Expert trial version 7.0.0. (Stat-Ease Inc., Minneapolis). Mathematical relationship between inputs and two selected outputs was presented by appropriate interaction polynomial model. The influence of certain factor was estimated based on its absolute value calculated for the coded factor values. It was showed that the k_{BI-II} 786 BS was under the strongest influence of *n*-butanol, while other factors i.e. internal phase, composition of surfactant mixture and triethylamine affected it in somewhat smaller but similar extent. On the other hand, the $S_{P/2-ABT}$ was mostly influenced by the content of triethylamine and the proportion of ionic and nonionic surfactant. ANOVA test was done and determination coefficients of 0.9764 and 0.9318 for *k* and *S* respectively, signified a good correlation among results.

The next step was method optimization by Derringer's desirability function. This function is defined as the geometric mean, sometimes weighted, of the individual desirability functions [2]. The equation 1 defines Derringer's desirability function:

$$D = \sqrt[n]{\left(\prod_{i=1}^n d_i^{r_i}\right)}$$

where *D* is the value of the global desirability function, d_i is the partial desirability function for each of the *n* responses and r_i is the relative importance assigned to the response *i*. Relative importance r_i is a comparative scale for weighting each of the resulting d_i in the overall desirability product and it varies from the least important ($r_i=1$) to the most important ($r_i=5$). The characteristics of a goal may be altered by adjusting the importance or weight. Weights lower than 1 give less emphasis to the goal, whereas weights greater than 1 give more emphasis to the goal. In both cases, d_i varies in a non-linear way while approaching the desired value, while with a weight of 1 d_i varies in a linear way [2]. A value of *D* close to 1 implies the combination of the different criteria is globally optimal, so that the response values are near defined target values.

In the present report the goal was to obtain the target value for k_{BI-II} 786 BS set at 5 with the lower and upper bound 3 and 7, respectively. The weights were set to 1 on the both sides. For the $S_{P/2-ABT}$ the goal was maximization in the range from 0 to 0.1, while the weight was adjusted to 1. The importance was set to 3 for both responses. Following the conditions and restrictions above, the optimization procedure was carried out. The predicted optimum was: 0.7% w/w butyl acetate, 1.0% w/w sodium dodecyl sulfate and 2% w/w Brij 35®, 7.6% w/w *n*-butanol and 0.75% w/w triethylamine. The corresponding global desirability *D* was 1. The predicted response values (5 for k_{BI-II} 786 BS and 0.28 for $S_{P/2-ABT}$) were confirmed experimentally. The observed difference between the predicted and experimental responses is found to be in good agreement and well within the acceptance limits at 95 % confidence interval.

Desirability-based optimization proved to be a valuable approach in optimizing parameters controlling separation in the proposed MELC method. It was confirmed that the appropriate selection of experimental design and optimization approach ensure the provision of

many useful information in the most efficient and reliable way.

REFERENCES

1. Debrus, B., et. al.: *Analytica Chimica Acta* 691 (2011) 33-42
2. Sivakumar T., et. al. *Journal of Separation Science* 30 (2007) 3143 – 3153

CENTRAL COMPOSITION DESIGN I N SEPARATION OF RAMIPRIL AND HYDROCHLOROTHIAZIDE

B. Jančić-Stojanović¹, B. Marković², A. Malenović¹, T. Rakić¹, A. Vemić¹, N. Kostić¹

¹University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis, Belgrade, Serbia

²Galenika a. d., Zemun, Serbia

In this paper, the optimization of high performance liquid chromatographic (HPLC) method for ramipril and hydrochlorothiazide determination is presented. Having chemically completely different structures, their chromatographic separation demands an attentive approach. To fulfill all the requirements for an optimal chromatographic run, the experimental design was employed. In order to define factors which should be investigated through the experimental design, careful preliminary study was conducted. As factors to be followed during the optimization, the content of acetonitrile in the mobile phase, pH of the mobile phase and the concentration of potassium-dihydrogenphosphate were chosen. All other factors (column: Thermo Hypersil gold C18 4.6 x 100 mm, 5 μm particle size, flow rate: 1 ml min⁻¹, temperature: 30 °C and wavelength 210 nm) were kept on defined levels. Chromatographic separation was done on the chromatographic system Waters Breeze consisted of Waters 1525 Binary HPLC Pump, Waters 2487 UV/VIS detector and Breeze Software, Windows XP, for data collection. For the optimization, central composite design (CCD) was chosen. The CCD is built of the full factorial 2^k design and star design [1, 2]. Finally, the CCD is completed by the addition of the central point. The total number of experiments *N* for 3 investigated factors is 18, where four experiments present replications. Mathematical relationship between inputs (for three factors) and outputs is presented as the second order polynomial model. As outputs, retention factors for active substances and selectivity factor were chosen. Significance of appropriate factor was estimated according to *p*-value. If *p*<0.0500, the influence of certain factor is significant, and vice versa. Thus, the retention behavior of both substances is under strong acetonitrile influence. Further, on the retention of hydrochlorothiazide, the concentration of potassium-dihydrogenphosphate was influential. Finally, on the retention between two substances, acetonitrile had the strongest influence as well as the interaction of two factors – pH and the concentration of potassium-dihydrogenphosphate. Also, ANOVA test was done and correlation coefficient higher than 0.9856 for all the outputs showed a good correlation among results. A good adequacy of the model was confirmed by *F* value. In the end, 3D graphs of the most influential factors on all three outputs were constructed.

On the basis of the obtained results, the optimal chromatographic conditions were set: 36 % of acetonitrile in the mobile phase, pH of the mobile phase 3.5 and the concentration of potassium-dihydrogenphosphate 20 mmol L⁻¹. It could be concluded that CCD was useful for the method development and evaluation.

REFERENCES

1. Deming, S. N., Morgan, S. L.: *Experimental design: a chemometric approach*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands 1993.
2. Ryan, P. T.: *Modern experimental design*. John Wiley & Sons Inc., New Jersey, USA 2007.

SIMULTANEOUS ANALYSIS OF TAXIFOLIN (DIHYDROQUERCETIN) AND VITAMIN C BY DERIVATIVE UV SPECTROSCOPY AND UPLC METHOD

Nada Pavicic, Ivan Velikinac, Ljiljana Milovanović
Department of Quality Control, Pharmanova,
Industrijska 8, 11500 Obrenovac

INTRODUCTION

There is a lack of articles using different analytical methods, in analysing taxifolin in combination with Vitamin C. High-performance, Liquid Chromatography, Mass spectrometry, polarimetry and NMR spectroscopy, are used for determining taxifolin from Bark of Pinus Contorta [1]. On the second hand, there are a numerous articles, and Pharmacopoeias [2,3] with various methods for determining vitamin C. Our aim was to develop two methods (UV-Vis and HPLC with Uv-Vis detector) for simultaneous analysis of the taxifolin and vitamin C in capsules. Therefore, we are focussed only on articles presenting analysis of vitamin C used HPLC, with UV or DAD. The assays on vitamin C, given in articles, included food derivatives, juices, multivitamin preparations and different beverages [4,5,6,7,].

MATERIALS AND METHODS

Taxifolin (dihydroquercetin) used as the working standard, manufactured by Ametis, Vitamin C used as the working standard, manufactured by Shadong luwei pharmaceutical, ethanol HPLC grade (J.T.Baker, U.S.A.), Hydrochloric acid p.a. (Fisher Scientific), Methanol HPLC grade (J.T.Baker, U.S.A.), ortho-phosphoric acid 85% (Merck) and water HPLC grade. Ketrax[®] capsules was manufactured by Pharmanova d.o.o. Obrenovac.

UV/VIS analysis was carried out on Lambda 16 Uv/Vis Spectrophotometer (Perkin - Elmer, USA). The absorbance of the standard, sample and blank solutions were measured after derivatization at 295.74 nm for taxifolin, and at 276.42 for vitamin C. using 10mm quartz cells.

UPLC analyses was performed on Acquity UPLC system (Waters, USA) equipped with Binary Solvent Manager, Sample Manager, column compartment and PDA detector. Separations were made on Waters Acquity UPLC BEH C18 column (50 mm L x 2.1 mm i.d., 1.7 μm particle size). Data acquisition was performed using Empower software. The analysis was performed at flow rate 0.4 ml/min, the detector wavelength was at 270 nm for vitamin C and at 290 nm for taxifolin. The column temperature was ambient and the injection volume was 1 μl. Gradient elution was used for separation.

Sample and standard preparation

The sample was prepared as follows for Uv/Vis analysis: 0.10g of powder obtained from 20 capsules was transferred into a 20.0 ml volumetric flask, added 2.0 ml 0,1M hydrochloric acid and diluted with

70% ethanol V/V to the mark. 1.0 ml of this solution is transferred into a 50.0 ml calibrated flask and dissolved to the mark with mixture of 0,1M HCL and 70% ethanol V/V (1:9). Standard stock solution of taxifolin and vitamin C for Uv/Vis (in mixture 0,1M HCL and 70% ethanol V/V (1:9)), was used for preparing the series solutions. Those solutions containing taxifolin and vitamin C of 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, and 14.0 μg/ml were used for preparing the calibration curve.

Sample preparation for the UPLC analysis: 0.10g of powder obtained from 20 capsules was transferred into a 20.0 ml volumetric flask, add 2.0 ml 0,1M hydrochloric acid and diluted with ethanol HPLC grade to the mark. The solution was filtered through 0,45 μm membran filter to a vial. Standard stock solution of taxifolin and vitamin C for UPLC analysis (in mixture 0,1M HCL and 70% ethanol V/V (1:9)) was used for preparing the series solutions. Those solutions containing taxifolin and vitamin C in concentration of 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, and 0.7 mg/ml were used for preparing the calibration curve.

RESULTS AND DISCUSSION

The proposed Uv/Vis and UPLC assays for the determination of taxifolin and vitamin C were validated for linearity, selectivity, accuracy and precision (repeatability). The calibration curves were established as dependence of absorbance/peak area on the taxifolin and vitamin C concentration. The Uv/Vis method was shown to be linear over the concentration range 6.0-14.0 μg/ml. The regression equations were: $y = 0.0032 + 0.0174x$, with correlation coefficient $r = 0.9999$ for taxifolin and $y = 0.0032 + 0.0174x$, with correlation coefficient $r = 0.9997$ for vitamin C, indicating good linearity. In the case of UPLC, linear response was over the concentration range 0.3-0.7 mg/ml. Over this concentration range, linear regression analysis of peak areas (y) versus concentrations (x) yielded the equations $y = 8065779x + 113037.7$ with $r = 0.9998$ for taxifolin and $y = 1178594x + 10086.71$ for vitamin C with $r = 0.9999$ which improve good linearity.

Selectivity of the methods was checked by observing if there was any interference from the excipients from capsules. Retention times of 0.4 min for vitamin C, and 0.9 min for taxifolin, showed, that the UPLC method can analyze both vitamin C and taxifolin in capsules in a very short time. The results obtained for assay precision, with six different concentrations of taxifolin and vitamin C, in two days, has shown RSD below 1.5 % for both methods. The accuracy of both methods were proven by determination of the taxifolin and vitamin C in laboratory, prepared dosage formulations containing defined quantities of the active substances (80, 100 and 120% levels of label claim). The recoveries obtained in Uv/Vis method varied from 99.99-102.76% for taxifolin, 97.69 -103.0% for vitamin C, and recoveries obtained in UPLC method are from 100.35 - 102.93% for taxifolin and 99.52 - 102.32% for vitamin C.

All these results have shown that there is no significant difference in determining the content taxifolin and vitamin C using both techniques.

REFERENCES

1. H. Outtrup, K. Schaumburg, Carlsberg Res. Commun. 50. (1985), p. 369 - 379
2. European Pharmacopoeia, 7th ed, Council of Europe, Strasbourg
3. The United States Pharmacopoeia 32th - National Formulary 27th, 12601 Twinbrook Parkway, Rocville, MD 20852, Baltimore, Maryland
4. L. L. Lloyd, F. P. Warner, C. A. White and J. F. Kennedy, Chromatographia, (1987), 24, 371-376
5. Lam, F.-L.; Holcomb, J. J.; Fusari, S. A. J. Assoc. Off. Anal. Chem., (1984), 67, 1007-1011
6. Ashoor, S. H.; Monte, W. C.; Welty, J., J. Assoc. Off. Anal. Chem., (1984), 67, 78-80
7. Mentasti, E.; Gennaro, M. C.; Sarzanini, C.; Baiocchi, C.; Savigliano, M., J. Chromatogr., (1985), 322, 177-189

APPROACHING EU - A CLOSER LOOK INTO EUROPEAN PROCEDURES FOR REGISTRATION OF MEDICINAL PRODUCTS: MRP AND DCP

Zorica Pejčić, Tanja Nedjić

Medicines and Medical Devices Agency of Serbia

INTRODUCTION

In order to get prepared for joining EU in the future, so called ex-Yugoslav countries are all on the same course of following EU regulatory rules for registration of medicinal products. Procedures that are especially important for these mainly generic markets are mutual recognition procedure (MRP) and decentralized procedure (DCP). National competent regulatory authorities as well as pharmaceutical industry are already dealing with registration documentation for medicinal products that are registered within EU through these two procedures.

AIM

Presentation of the most important phases and dates within MRP and DCP.

Short overview of ALIMS position regarding registration documentation for medicines already registered in EU through MRP or DCP.

LEGAL BASIS

Directive 2004/27/EC and relevant EU and HMA guidances.

DISCUSSION

If an applicant plans to obtain marketing authorisation for a medicinal product in more than one EU member state (MS) at the same time, application for MRP or DCP should be submitted, provided that the medicinal product doesn't require centralised procedure application. The MS that is preparing the expert report is reference member state (RMS), while other states that are included in the procedure are concerned member states (CMS). Submitted documentation is the same for all MS, except for some country specific differences in administrative part.

- » **MRP:** used for the products already having marketing authorisation in one or more member states.
- » **DCP:** used for the products not yet registered within EU.

These procedures consist of several clearly defined phases which are strictly followed by all MS.

MAIN MRP PHASES

- » Preliminary phase (approx. 90 days before start of the procedure: discussion between applicant and RMS about upgrading documentation, RMS preparing draft expert report)
- » Submission of documentation and validation (D₋₁₄)
- » Start of the procedure (D0)
- » CMS comments/questions (D50)
- » CMS final opinion (D85)
- » End of the procedure (D90).

Main DCP phases:

- » Preliminary phase (short: discussion between applicant and RMS about application)
- » Submission of documentation and validation (D₋₁₄)
- » Start of the procedure (D0)

- » RMS assessment of documentation and preparing preliminary report (D0 – D70)
- » CMS comments/questions (D70-D100)
- » RMS finishes draft expert report (D120)
- » CMS comments/questions (D145)
- » CMS final opinion on draft expert report (D205)
- » End of the procedure (D210).

In cases of different opinions, unsolved problems regarding procedural or scientific issues, and if no consensus is reached among MS, help is provided by the CMD group and CHMP.

After the end of the procedure, the national phase starts, in which each MS grants its licence for the product.

All MS are connected through common database (Communication and Tracking System - CTS) which contains all the important information about each procedure. The procedure is initiated and finished by the RMS, and data are regularly filled into the database by each MS as the procedure goes on.

Member states have close cooperation in assessment of documentation, and after the procedure is finished, the marketing authorisation is granted in each MS.

ALIMS POSITION

During past few years, ALIMS received many applications for medicinal products that were already registered in EU through MRP or DCP. These applications are processed through national procedure. The same documentation as submitted in EU for MRP/DCP is required, together with all the later variations that were approved for the product until the date of the submission of the documentation to ALIMS. The final expert report issued by RMS is sometimes required to further support and clarify submitted documentation.

CONCLUSION

For granting marketing authorisation for a medicinal product in more than one EU MS at the same time, MRP or DCP applications are often used. Getting more familiar with these procedures enable countries who aim to join EU to be better prepared for the processes that are expecting them in the future.

ALIMS has a lot of experience in assessing documentation for medicinal products that were already registered in EU through MRP or DCP. For taking part in these procedures in EU, resources and internal procedures need to be additionally developed.

REFERENCES

1. Directive 2004/27/EC.
2. Notice to Applicants Volume 2A Procedures for marketing authorisation CHAPTER 2 Mutual Recognition February 2007.
3. www.hma.eu.

WHICH ONE IS COUNTERFEIT DRUG?

Golcorbin-Kon S.^{1,3}, Mikov M.,^{2,3}

¹Department of Pharmacy, Medical Faculty Novi Sad, Serbia

²Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Medical faculty Novi Sad, Serbia

³Faculty of Pharmacy, Podgorica, University of Montenegro

INTRODUCTION

According to the World Health organization, counterfeit drugs become a growing threat for population. Counterfeit medicines are medicine that are deliberately and fraudulently mislabeled with respect to identity and/or source. All kinds of medicines have been counterfeit, branded and generic. Counterfeit medicines may include products with the correct or with wrong ingredients, without active or with insufficient or too much active ingredients, or with fake packaging.

DISCUSSION

The counterfeiting of medicines has been known of since around 1990 and is a growing problem in both developing and developed countries. Around 2500 people are believed to have died in Niger in 1995 after they were given a fake meningitis vaccine. The consumption of paracetamol syrup prepared using glycerol, which was contaminated with diethyl glycol (a toxic chemical used as an anti-freeze), resulted in the death of 89 people in Haiti in 1995. Up until 1999, of 771 cases of counterfeit drugs reported to WHO, indications about the quality of the active ingredients contained were supplied only for 325 cases. Of these, about 59% contained no active ingredients, 7% contained the incorrect amount of active ingredients and 16% contained different active ingredients. The majority of counterfeit cases involve tablets and capsules. Antibiotics account for almost half of the reported cases of counterfeit drugs.

Counterfeit medicines are estimated as more than 10% of the global medicine market and in some developing countries it is thought to be as high as 50%. Since counterfeit drugs first time appeared, they have been more sophisticated and more difficult for detection. The increased occurrence of counterfeit medicines has several serious consequences. These may include illness or death of patients, higher medical insurance and lost revenues to pharmaceutical manufacturer and governments. Children are particularly at risk.

Counterfeiting of pharmaceuticals is a criminal activity often undertaken by people and organizations involved in other types of crime. The supply of counterfeit drugs is more pronounced in countries where the manufacture, importation, distribution, supply and sale of medicines are less regulated and enforcement weak. The growth in international trade of pharmaceutical ingredients and medicines adds a further dimension of complexity to this issue. For example, trade through brokers and free zones where regulation is lax or absent (and medicines repackaged and relabeled to conceal country of origin) is increasing. In over 50% of cases, medicines purchased over the Internet from illegal sites that conceal their physical address have been found to be counterfeit.

In most industrialized countries with effective regulatory system and market control (i.e. Australia, Canada, New Zealand, most of the European Union and the United States of America), incidence of counterfeit medicines is extremely low-less than 1% of market value according to the estimates of the countries concerned.

Counterfeiting medicines can be very lucrative. Since many countries have not yet enacted deterrent legislation, counterfeiters often do

not fear prosecution. Stringent regulatory control of medicines and enforcement by national medicines regulatory authorities contributes significantly to prevention and detection of counterfeit medicines. WHO provides direct country and regional support for strengthening medicines regulation.

In 2006, WHO helped to create the International Medical products Anti-Counterfeiting Taskforce, or IMPACT. The aim is to involve a range of stakeholders in collaborative efforts to protect people from buying and taking counterfeit medicines. To prevent the manufacture and distribution of counterfeit medicines, IMPACT's areas of focus are: legislative and regulatory infrastructure, regulatory implementation, enforcement, technology and communication.

CONCLUSION

The fight against counterfeit medicines effectively, a range of stakeholders-not just health professionals-is needed. Governments should establish and/or strengthen their drug regulatory authorities with responsibility for the registration and inspection locally manufactured and imported medicines. National laws should ensure that the manufacture, trade, distribution and sale of medicines are effectively regulated. Adequate training and powers of enforcement against counterfeits should be given to personnel from drug regulatory authorities, the judiciary, customs and policy. Drug regulatory authorities should initiate widespread use of screening tests for the detection of counterfeits. Partnership should be established between health professionals, importers, industry and local authorities to combat counterfeits. Countries in the same region should work towards the harmonization of their marketing authorization procedures. Countries with experience in combating counterfeit drugs should provide assistance to others for training in areas related to quality control, drug detection and enforcement.

REFERENCES

1. Bogdanich W., Hooker J., Lehren AW. An article reported by and written by Bogdanich W in New York Times, October 31, 2007, "Chinese chemicals flow unchecked to World Drug Market". Available from: 2. <http://www.nytimes.com/2007/10/31/world/asia/31chemical.html>
2. CALIMS, Agencija za lijekove i medicinska sredstva Crne Gore. Available from: <http://calims.me/>
3. Counterfeit pharmaceuticals in Canada, August, 2006. Available from: http://www.cisc.gc.ca/pharmaceuticals/documents/counterfeit_pharmaceuticals_e.pdf
4. FDA Counterfeit drugs: question and answers, accessed February 13, 2004, October 1, 2008, January 7, 2010. Available from: <http://fda.gov/oc/initiatives/counterfeit/qa.html>
5. Reggi V., IMPACT, WHO, Counterfeit medicines: an intent to deceive. WHO Pharmaceut Newsletter 2006; 5:7-9
6. World Health Organisation. Substandard and counterfeit medicines. Available from: [http://who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs275/en/](http://who.int/mediacentre/factsheets/fs275/en/)

This work has been supported by Ministry of Science and technological development of Serbia N^o 41012

DETERMINATION OF ALL-RAC-ALPHA-TOCOPHEROL AND ALL-RAC-ALPHA-TOCOPHERYL ACETATE (SYNTHETIC VITAMIN E) IN COSMETIC PREPARATIONS

Biljana Nastova, Sandra Atanasovska, Dragica Doneva, Zorica Arsova-Sarafinovska

Institute for Public Health of the Republic of Macedonia, Department for Quality Control of Medicines, Skopje, Republic of Macedonia

Different forms of tocopherols, together with tocotrienols, are collectively named as vitamin E, (a lipid-soluble vitamin with antioxidation effect in several stages of peroxidation of lipids *in vivo*) and each possesses different degree of medical, biological and physiochemical significance. Among four tocopherols (α -, β -, γ - and δ -tocopherol), alpha-tocopherol has been reported to possess the highest biological activity (1). In order to obtain the larger amounts, vitamin E is synthesized as a racemic mixture of D- and L- forms which are optical isomers, unlike a natural tocopherol that is found only in the D-form. Synthetic vitamin E is derived from petroleum products as all-racemic alpha tocopherol and its ester form all-racemic alpha tocopheryl acetate (or DL-tocopheryl acetate). The tocopheryl esters are more stable for an extended time of use (2).

In the belief that vitamin E is a natural skin conditioner and humidifier, it is used in cosmetic industry in the preparation of lipsticks, shadows, powders, humidifiers, soaps, creams, shampoos etc. (3). The recent popularity of vitamin E preparations for topical application, together with reports of adverse dermatological reactions linked to cosmetics containing this vitamin led to concern about the desirability of including these compounds in such products (4). Therefore, a sensitive, accurate and rapid HPLC method was developed for determination of alpha-tocopherol and its ester form in cosmetics.

The chromatographic separation was performed on a column Purospher Star® RP 18 (150 x 4.0 mm i.d., 5 μ m), with a mobile phase consisted of a methanol - *n*-hexane (90:10, V/V) The flow rate was kept at 1.2 ml min⁻¹. Detection of all-racemic alpha-tocopherol and the ester form all-racemic alpha-tocopheryl acetate was carried out at 220 nm. Effect of various parameters (different concentration of methanol and *n*-hexane in the mobile phase composition and different columns used), and the separation of alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl acetate from other numerous ingredients present in cosmetic preparations was studied.

The proposed method was fully validated according to the ICH guidelines in terms of accuracy, precision, linearity, limit of detection and quantification and range (5). The method is sensitive and allows detection of active components in concentrations of 0,007 μ g and 0,011 μ g for α -tocopherol, and α -tocopherol acetate, respectively, while the lowest concentrations that could be determined were 0,023 μ g, and 0,033 μ g for α -tocopheryl acetate and α -tocopherol, respectively.

REFERENCES

1. Changa LC, Chang HT, Suna SW. Cyclodextrin modified microemulsion electrokinetic chromatography for separation of α -, γ -, δ -tocopherol and α -tocopherol acetate. *J. Chromatogr. A*, 1110 2006;1110: 227-234.
2. Burton GW, Ingold KU, Foster DO, Cheng SC, Webb A, Hughes L, Lusztyk E. Comparison of free α -tocopherol and α -tocopheryl acetate as sources of vitamin E in rats and humans. *Lipids* 1988; 23(9): 834-40.
3. Pehr K, Forsey RR. Why don't we use vitamin E in dermatology? *Can. Med. Assoc. J.* 1993;149: 1247-1253
4. Sheppard PE, Stutsman MJ. Determination of vitamin E in cosmetic products by gas-liquid chromatography (GLC). *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1977;28: 115-123.

5. ICH Q2R1: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Proceeding of the International Conference on Harmonisation of technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 1996.

ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ALL-RAC-АЛФА-ТОКОФЕРОЛ И ALL-RAC-АЛФА-ТОКОФЕРИЛ АЦЕТАТ (СИНТЕТСКИ ВИТАМИН Е) ВО КОЗМЕТИЧКИ ПРОИЗВОДИ

Билјана Настова, Сандра Атанасовска, Драгица Донева, Зорица Арсова-Сарафиновска

Институт за јавно здравје на Република Македонија, Сектор за испитување и контрола и на лекови, 50 Дивизија Бр. 6, 1000 Скопје, Република Македонија

Различни форми на токофероли и токотриеноли се нарекуваат со заедничко име - витамин Е (липосолубилан витамин со антиоксидативен ефект во процесот на пероксидација на липиди *in vivo*) и поседуваат различен степен на медицинско, биолошко и физико-хемиско значење. Од сите форми (α -, β -, γ - and δ -токоферол) најголема биолошка активност има алфа-токоферолот (1).

Со цел да се добие поголемо количество на витамин Е, тој се добива синтетски како рацемска смеша од D- and L-форми, кои се оптички изомери, за разлика од природниот токоферол кој се сретнува само во D-форма. Синтетскиот витамин Е се добива од петролеум-базирано производство како *all-rac*-алфа-токоферол и во естерска форма како *all-rac*-алфа-токоферил ацетат (или DL-алфа-токоферил ацетат). Естрите на токоферолот се постабилни за подолг рок на употреба (2).

Познато е дека витаминот Е е природен кондиционер за кожа и навлажнувач, заради што се употребува во козметичката индустрија, во подготвување на кармини, сенки за очи, пудри, навлажнувачи, сапуни, креми, шампони и др. (3). Во поново време во литературата се известува за појава на несакани дерматолошки реакции при употреба на козметички препарати што го содржат овој витамин, што ја доведува во прашање широката употреба на витамин Е во препаратите за локална употреба (4). Заради тоа, ние развиеме сензитивен, точен и брз HPLC метод за определување на алфа-токоферол и неговиот естер во козметичките препарати.

Хроматографското раздвојување се изведува на колона Purospher Star® RP 18 (150 x 4.0 mm i.d., 5 μ m), со мобилна фаза од метанол-*n*-хексан (90:10, V/V) изократно, со брзина на проток од 1, 2 ml min⁻¹. Детекцијата на *all-rac*-алфа-токоферол и *all-rac*-алфа-токоферил ацетат се изведува на бранова должина од 220 nm. Се испитува ефектот на различните параметри (различна концентрација на метанол и *n*-хексан во мобилната фаза, како и различни хроматографски колони) на разделувањето на алфа-токоферол и алфа-токоферил ацетат од останатите бројни состојки присутни во козметичките препарати.

Предложениот метод е целосно валидиран според ICH упатствата преку испитување на точност, прецизност, линеарност, лимит на детекција и квантификација и опсег (5). Методот е сензитивен и овозможува детекција на активната компонента во концентрација од 0,007 μ g алфа-токоферил ацетат и 0,011 μ g алфа-токоферол, додека најниска концентрација што може да се определи беше

0,023 µg алфа-токоферил ацетат и 0,033 µg алфа-токоферол.

ЛИТЕРАТУРА

1. Changa LC, Chang HT, Suna SW. Cyclodextrin modified microemulsion electrokinetic chromatography for separation of α -, γ -, δ -tocopherol and α -tocopherol acetate. *J. Chromatogr. A*, 1110 2006;1110: 227-234.
2. Burton GW, Ingold KU, Foster DO, Cheng SC, Webb A, Hughes L, Luszyk E. Comparison of free α -tocopherol and α -tocopheryl acetate as sources of vitamin E in rats and humans. *Lipids* 1988; 23 (9): 834-40.
3. Pehr K, Forsey RR. Why don't we use vitamin E in dermatology? *Can. Med. Assoc. J.* 1993;149: 1247-1253
4. Sheppard PE, Stutsman MJ. Determination of vitamin E in cosmetic products by gas-liquid chromatography (GLC). *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1977;28: 115-123.
5. ICH Q2R1: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Proceeding of the International Conference on Harmonisation of technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 1996.

DEGRADATION OF MYCOPHENOLATE MOFETIL UNDER OXIDATIVE STRESS CONDITIONS

Ana Protić¹, Ljiljana Živanović¹, Marina Radišić²,
Mila Laušević²

¹University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Department of Drug analysis, Vojvode Stepe 450, 11 152 Belgrade, Serbia

²University of Belgrade, Faculty of Technology and Metallurgy, Department of Analytical Chemistry, Karnegijeva 4, 11 000 Belgrade, Serbia

INTRODUCTION

Inherent chemical stability of the active pharmaceutical ingredient (API) largely determines the stability of the final drug product (DP), and regulatory authorities require novel chemical entities to undergo extensive chemical stability evaluation through stress testing (1,2). Mycophenolate mofetil (MMF) is an immunosuppressive agent, which is mostly used in solid organ transplant patients to prevent organ rejection. MMF is pro drug that is rapidly absorbed and hydrolyzed to form free Mycophenolate mofetil (MPA), the active metabolite, which is considered as impurity in the final DP (3).

OBJECTIVES

The main objectives of this investigation were determination of the influence of oxidative stress agent on MMF stability and identification of unknown key-degradation products, if any.

MATERIALS AND METHODS

MMF was purchased from Sigma. HPLC analysis was performed with an Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) HP 1200 chromatograph equipped with on-line degasser, binary pump, column oven, diode array detector, and Rheodyne 20-mL loop injector. Data was acquired by means of HP ChemStation software. Before HPLC performing, all mobile phases were degassed and vacuum filtered through 0.45 µm nylon membranes. The chromatographic conditions included Chromolith RP-18e (100 mm x 4.6 mm, macropore size 2 µm, mesopore size 13 nm) column, flow rate of the mobile phase of 1 mL min⁻¹, the chosen temperature of the column of 40°C and composition of the mobile phase of acetonitrile – 0.015 M ammonium acetate (pH 4.4) (28:72, v/v). The pH of the water phase was adjusted to 4.4 with glacial acetic acid, and oxidation product was analyzed in the positive ionization (PI) mode, though MPA was detected in the negative ionization (NI) mode

with the proposed mobile phase. The mass spectrometer operated in full scan mode and for all the experiments spray needle voltage was set at 4.5 kV. Nitrogen was used as a sheath and auxiliary gas, and values (a scale of arbitrary units in the 0–100 range defined by the LCQ Advantage system) of their flow rate were 50 and 0, respectively. The capillary temperature was maintained at 290 °C and Helium was used as the collision gas.

RESULTS AND DISCUSSION

The influence of 3%, 10% and 15% H₂O₂, as oxidation agent, on MMF was investigated in duration of 1h. Adding 10% H₂O₂ resulted in degradation of 17.90% of drug amount and MPA, first (DP I) and second oxidation products (DP II) were formed.

The importance of all degradation products was estimated considering key-degradants rule (4). Therefore, the main degradation product was DP II with 41.67% of total degradation followed by MPA with 14.32% of total degradation and 34% of the largest degradant. On the other side, DP I appeared in 3% of total degradation and 7.09% of the largest degradant. Considering these results DP II and MPA could be noted as key-degradants, whereas DP I is not significant. In order to identify key-degradant denoted as DP II LC-MSⁿ analysis was performed. In full scan mode were observed positive ions *m/z* 434 corresponding to MMF, *m/z* 336 corresponding to DP I, *m/z* 450 corresponding to DP II and negative ion *m/z* 319 corresponding to MPA. Along with *m/z* 450 adduct ions [M+Na]⁺ (*m/z* 472) and [M+K]⁺ (*m/z* 488) have been formed. DP II has *m/z* 450 and is 16 units higher than *m/z* 434 of MMF, indicating oxidation of MMF and arisen of its N-oxide. To confirm the identity of DP II the MSⁿ analysis of all analytes has been conducted. The MSⁿ analysis was performed by infusing sample subjected to 15% H₂O₂ directly to the mass spectrometer, with the syringe pump at the 5 µl min⁻¹. Obtained fragments for mycophenolate mofetil, mycophenolic acid and DP II, all in positive ionization mode, together with their relative abundances confirmed the structure of DP II. The identical fragmentation pattern for both MMF and DP II strongly indicates the same main structure of these compounds.

CONCLUSION

Mycophenolate mofetil showed to be instable towards oxidation agents and three degradation products have been formed. LC-MSⁿ analysis was used to resolve the structure of key-oxidation product N-oxide of MMF.

REFERENCES

1. ICH topic Q1A (R2), Stability Testing on New Drug Substances and Products, Fed. Reg. 2003, 68, 65717-65718.
2. A. Dunge, N. Sharda, B. Singh, S. Singh, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 37, 1109-1114.
3. B. Katzung, *Basic and Clinical Pharmacology*, McGraw-Hill Medical Publishing Division: New York, NY, 2004, 589-589.
4. K. M. Alsante, A. Ando, R. Brown, J. Ensing, T. D. Hatajik, W. Kong, Y. Tsuda, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59, 29-37.

VALIDATED HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF SILDENAFIL IN PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS

Z. Poposka, M. Shishovska, K. Starkoska, Z. Arsova-Sarafinovska

Institute for Public Health of the Republic of Macedonia, 50 Divizija 6, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

INTRODUCTION

Sildenafil is oral drug used primarily to treat male sexual function problems (impotence or erectile dysfunction) since becoming available in 1998. It is a potent and selective inhibitor of cGMP specific phosphodiesterase type 5 (PDE5) in the *corpus cavernosum*, where PDE5 is responsible for degradation of cGMP. Sildenafil has a peripheral site of action on erections. This substance has no direct relaxant effect on isolated human *corpus cavernosum* but potently enhances the relaxant effect of NO on this tissue.

However, there is no analytical method for determination of this active compound in pharmaceutical preparations in the current European and US Pharmacopoeia.

The aim of this study was to develop and validate HPLC method for sildenafil analysis in pharmaceutical dosage forms.

MATERIALS AND METHODS

HPLC analysis was performed using a Shimadzu LC-2010 chromatographic system (Shimadzu, Kyoto, Japan) consisting of a LC-20AT Prominence liquid chromatograph pump with DGU-20A5 Prominence degasser, a SPD-M20A Prominence Diode Array Detector, RF 10AXI fluorescence detector and a SIL-20 AC Prominence auto sampler. Data analyses were done using Class VP 7.3 Software. The elution was carried out on a column Hypersil BDS-C18 (125 x 4 mm i.d., 5 mm), mobile phase consisted of phosphate buffer (20 mM, pH 2.8)-acetonitrile (71:29, V/V), flow rate 1.5 mL min⁻¹, at controlled temperature (25°C) and autosampler temperature at 4°C. Detection of sildenafil was carried out at 285 nm. Commercially available, film-coated tablets, containing 50 mg sildenafil as sildenafil citrate, were used in this study.

RESULTS AND DISCUSSION

The method was fully validated according to the ICH (International Conference on Harmonization) guidelines by determination of linearity, precision, accuracy, limit of detection and limit of quantification. Linearity of the method was tested in the range of: 2 – 100 mg mL⁻¹ sildenafil (Fig. 1). Experimental data showed high level of linearity which was proved with the value for the correlation coefficient ($R^2 = 0.9994$).

Limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the method were tested in the range of: 20 – 200 ng mL⁻¹ sildenafil. The results were: 0.23 ng and 0.68 ng for LOD and LOQ, respectively (9.2 ng mL⁻¹ and 27.2 ng mL⁻¹ for LOD and LOQ, respectively, obtained with 25 mL injected).

Selectivity of the method was proved with the chromatographic peak resolution obtained between sildenafil and tadalafil ($R_s = 10, 5$)

(Fig. 2) and the characteristic UV-spectrum.

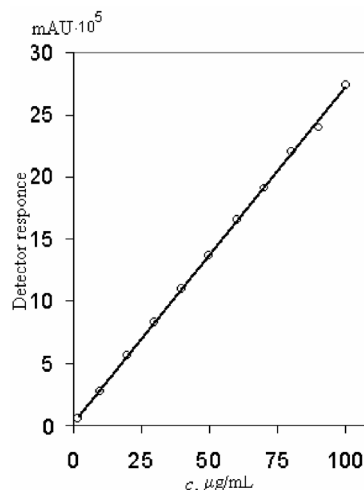


Fig. 1. A typical sildenafil calibration line, with regression line $Abs = 27066 conc. + 14033$, and $R^2 = 0,9994$

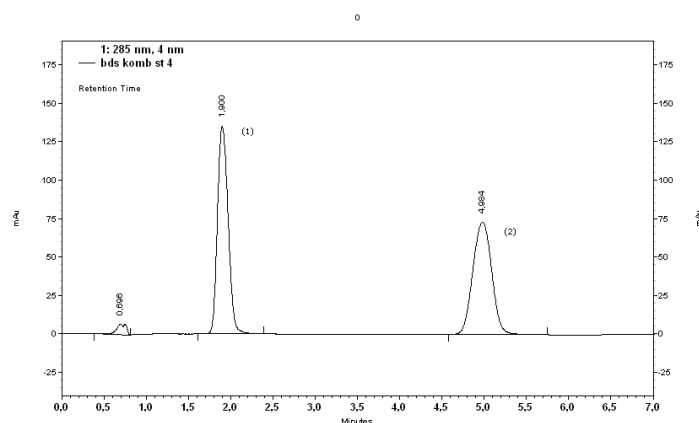


Fig. 2: Typical chromatogram obtained from a mixed standard solution: sildenafil (1), tadalafil (2).

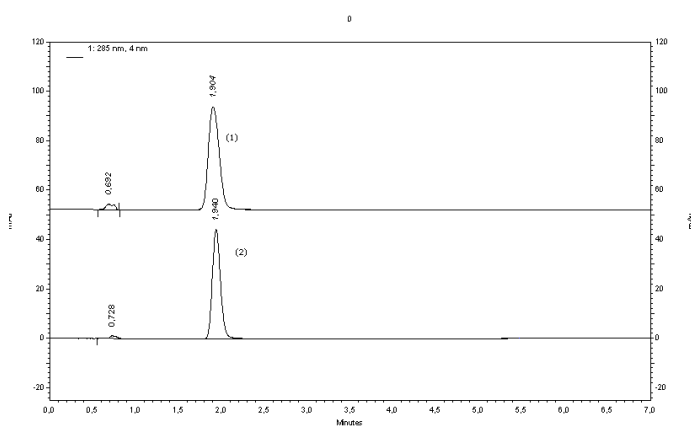


Fig. 3: Typical chromatogram obtained from sildenafil in: standard solution (1), test solution (2).

Mean recovery for sildenafil was between 99,74% and 100,88% indicating that the developed method was accurate for determination of sildenafil in pharmaceutical formulation.

The proposed method was successfully applied for determination of sildenafil in film-coated tablets, containing 50 mg sildenafil as sildenafil citrate (Fig. 3).

CONCLUSIONS

The results of the validation demonstrated that the proposed analytical procedure is accurate, precise and reproducible for sildenafil analysis in pharmaceutical dosage forms. Furthermore, this procedure is relatively inexpensive and simple and is particularly suitable for routine analyses when tandem mass spectrometric detection is not available. Additionally, it is important to mention that decreased consumption of organic solvent considerably reduces the laboratory expenses.

REFERENCES

1. Vardi M, Nini A (2007). Phosphodiesterase inhibitors for erectile dysfunction in patients with diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev* (1): CD002187. doi:10.1002/14651858.CD002187.pub3. PMID 17253475.
2. Pomeranz HD and Bhavsar AR (2005). Nonarteritic ischemic optic neuropathy developing soon after use of sildenafil (Viagra): a report of seven new cases. *J. Neuroophthalmol.* 25 (1): 9-13. PMID 15756125.
3. Webb DJ, Freestone S, Allen MJ, Muirhead GJ. (March 4, 1999). Sildenafil citrate and blood-pressure-lowering drugs: results of drug interaction studies with an organic nitrate and a calcium antagonist. *Am. J. Cardiol.* 83 (5A): 21C-28C. doi:10.1016/S0002-9149(99)00044-2. PMID 10078539.
4. Francis SH, Morris GZ, Corbin JD. Molecular mechanisms that could contribute to prolonged effectiveness of PDE5 inhibitors to improve erectile function. *Int. J. Impot. Res.* 2008 Jul-Aug;20(4):333-42.
5. ICH Q2R1: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Proceeding of the International Conference on Harmonisation of technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 1996.

ВАЛИДИРАН HPLC МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА СИЛДЕНАФИЛ ВО ДОЗИРАНИ ФАРМАЦЕВТСКИ ФОРМИ

Ж. Попоска, М. Шишовска, К. Старкоска, З. Арсова-Сарафиновска

Институт за јавно здравје на Република Македонија, Сектор за испитување и контрола и на лекови, 50 Дивизија Бр. 6, 1000 Скопје, Република Македонија

ВОВЕД

Силденафил е лек кој се користи првенствено за лекување на проблеми со импотенција или еректилна дисфункција, од моментот кога станува комерцијално достапен во 1998 година. Силденафил е потентен и селективен инхибитор на ензимот cGMP-специфична фосфодиестераза тип 5 (PDE5) во *corpus cavernosum* каде PDE5 ензимот е одговорен за деградација на cGMP. Силденафил поседува периферен механизам на дејство. Оваа супстанција нема директен ефект на опуштање на *corpus cavernosum*, но има силен ефект на релаксација на NO на оваа ткиво.

Меѓутоа, во важечкото издание на европската и американската фармакопеја не постои аналитички метод за одредување на оваа активна компонента во фармацевтските препарати.

Целта на ова истражување беше да се развие и валидира HPLC метод за анализа на силденафил во фармацевтски дозирани форми.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

HPLC анализата беше изведена на хроматографски систем Schimadzu LC-2010 (Schimadzu, Kyoto, Japan) составен од: 20AT Prominence пумпа, DGU-20A5 Prominence дегазер, SPD-M20A Prominence DAD детектор, RF 10AXI флуоресцентен детектор и SIL-20 AC Prominence автосемплер. Анализата на податоците се врши со користење на софтвер Class VP 7.3. Хроматографската сепарација беше изведена на колона Hypersil BDS-C18 (125 x 4 mm i.d., 5 mm), со мобилна фаза составена од фосфатен пуфер (20 mM, pH 2.8)-ацетонитрил (71:29, V/V), со проток од 1.5 mL min⁻¹, на температура од 25°C и температура на автосемплер од 4°C. Детекцијата на силденафил беше изведена во 285 nm.

Во ова истражување беа користени комерцијално достапни, филм-обложени таблети, кои содржат 50 mg силденафил во облик на силденафил цитрат.

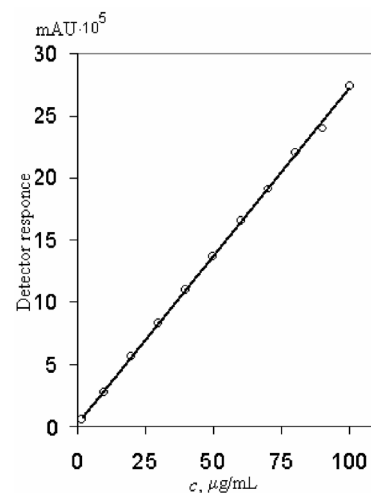
РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Методот беше комплетно валидиран во согласност со насоките на ICH (Меѓународна конференција за хармонизација), преку определување на линеарност, прецизност, точност, лимит на детекција и квантификација.

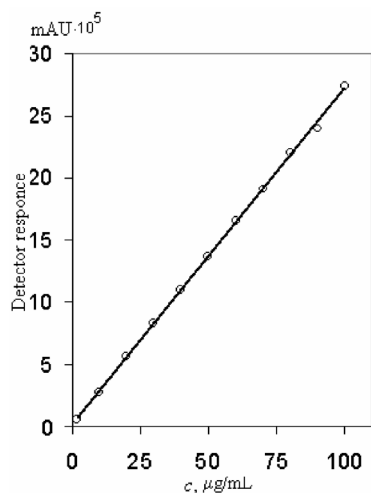
Линеарноста на методот беше испитана во опсег од: 2 – 100 mg mL⁻¹ силденафил. (Фигура 1). Експерименталните податоци покажаа високо ниво на линеарност, што се потврдува и со вредноста на коефициентот на корелација ($R^2 = 0.9994$).

Лимитот на детекција (LOD) и квантификација (LOQ) на методот беа испитани во опсег од: 20 – 200 ng mL⁻¹ силденафил. Добиените вредности се: 0.23 ng и 0.68 ng за LOD и LOQ, соодветно (9.2 ng mL⁻¹ и 27.2 ng mL⁻¹ за LOD и LOQ, соодветно, добиени со инјектирање на 25 mL).

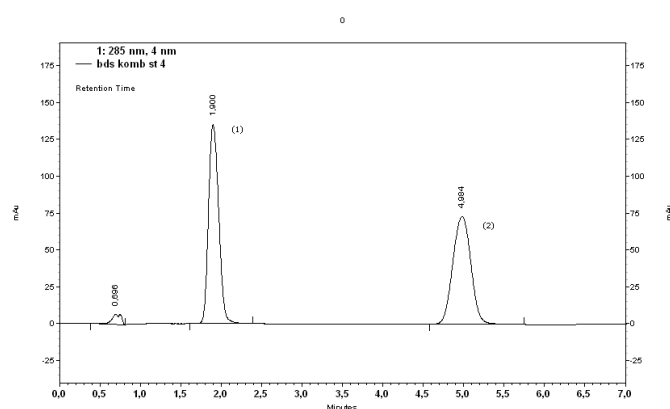
Селективноста на методот беше потврдена со резолуцијата добиена помеѓу пикот на силденафил и пикот на тадалафил ($R_s = 10, 5$) (Фигура 2) и карактеристичниот UV-спектар.



Фиг. 1. Типичен баждарен дијаграм за силденафил, со равенка на регресија $Abs = 27066 conc. + 14033$, и $R^2 = 0,9994$



Фиг. 2. Типичен хроматограм добиен од мешан стандарден раствор: силденафил (1), тадалафил (2).



Фиг. 3. Типичен хроматограм добиен од силденафил во: стандарден раствор (1), пробен раствор (2).

Просечниот аналитички принос за силденафил беше од 99,74% до 100,88% што покажува дека предложениот метод е точен за определување на силденафил во фармацевтски препарати. Предложениот метод беше успешно применет за определување на силденафил во дозирни фармацевтски форми (Фигура 3).

ЗАКЛУЧОЦИ

Резултатите од студијата за валидација покажуваат дека предложениот аналитички метод е точен, прецизен и репродуцибилен за анализа на силденафил во фармацевтски препарати. Дополнително, оваа аналитичка постапка е релативно евтина и едноставна и е особено погодна за рутински анализи кога масена спектрометрија не е на располагање. Исто така, важно е да се спомне дека намалената потрошувачка на органски растворувач значително ги намалува лабораториските трошоци.

ЛИТЕРАТУРА

- Vardi M, Nini A (2007). Phosphodiesterase inhibitors for erectile dysfunction in patients with diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev* (1): CD002187. doi:10.1002/14651858.CD002187.pub3. PMID 17253475.
- Pomeranz HD and Bhavsar AR (2005). Nonarteritic ischemic optic neuropathy developing soon after use of sildenafil (Viagra): a report of seven new cases. *J. Neuroophthalmol.* 25 (1): 9-13. PMID 15756125.
- Webb DJ, Freestone S, Allen MJ, Muirhead GJ. (March 4, 1999). Sildenafil citrate and blood-pressure-lowering drugs: results of drug interaction studies with an

organic nitrate and a calcium antagonist. *Am. J. Cardiol.* 83 (5A): 21C-28C. doi:10.1016/S0002-9149(99)00044-2. PMID 10078539.

4. Francis SH, Morris GZ, Corbin JD. Molecular mechanisms that could contribute to prolonged effectiveness of PDE5 inhibitors to improve erectile function. *Int. J. Impot. Res.* 2008 Jul-Aug;20(4):333-42.

5. ICH Q2R1: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Proceeding of the International Conference on Harmonisation of technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 1996.

EFFECT OF HYDRODYNAMICS ON THE DISSOLUTION TEST OF BCS CLASS II ACTIVE COMPONENT FORMULATED AS SOLID DOSAGE FORM WITH IMMEDIATE RELEASE

Irena Brašnarska, Nataša Karalija, Suzan Memed-Sejfulah, Sanja Simeonovska, Gjorgji Petruševski, Ema Kikovska-Stojanovska, Biljana Šapkareva, Sonja Ugarkovic

Research and Development, ALKALOID AD, Aleksandar Makedonski 12, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

INTRODUCTION

The *in vitro* dissolution test in the last few decades of drug product development has distinguished as important physicochemical tool for evaluation of the pharmaceutical quality and bioavailability of the product. Dissolution method development must be considered as a continuing process that needs to adapt to changes as the product changes. Specific drug substance information like: solubility, pKa, stability as a function of pH and BCS classification give directions to the research team to develop product specific discriminatory dissolution method. Different rotation speeds, different mediums and different apparatus must be evaluated to define dissolution method that can provide appropriate measure of product performance, but also have sufficient discriminatory power to detect changes in the formulation. Film-coated tablets with immediate release and incorporated BCS Class II active component [1] (low solubility, high permeability), pKa ~ 4.5 were evaluated in this study. The active component has a pH dependent solubility and increase of the pH would enhance its solubility and consequently the dissolution rate, particularly at pH > pKa of the compound. (Fig.1) Solubility of the active substance was determined by shake-flask method in three different media. The results were 0.00385 mg/ml, 0.0113 mg/ml and 0.143 mg/ml for pH 2.2, pH 4.5 and pH 6.8, respectively. The active component is completely ionized and rapidly dissolved in the intestinal region with an average of pH ~ 6.5. As a result, phosphate buffer pH 6.8 [2] was chosen as physiologically relevant and in accordance with the regulatory requirements.

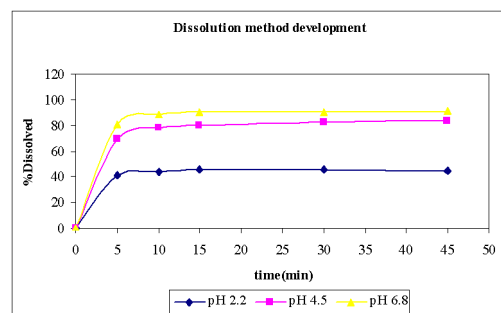


Figure1. Dissolution profiles at different pH media

METHODS AND MATERIALS

The content of dissolved active substance was quantified using HPLC method with UV detection at 246 nm, VWR Hitachi Elite La Chrom. Separation was performed on RP Select B 125 x 4.0mm 5µm column. Dissolution test was performed on Varian VK 7025 Dissolution tester using Apparatus I (basket) and Apparatus II (paddle). Dissolution profile time points used were 5, 10, 15, 30 and 45 minutes, and for the dissolution end point test 30 minutes was chosen. Quantitatively proportional film-coated tablets with different dosage strengths produced with the same manufacturing process were used for experimental purposes.

RESULTS AND DISCUSSION

a) Influence of rotation speed

The effect of hydrodynamics on the dissolution rate of the active principle from the formulation has been evaluated by varying paddle rotation speed. The evaluation was performed with dissolution end point test with rotations of 50 rpm, 75 rpm and 100 rpm. On 50 rpm coning was noticed which lead to incomplete release of active ingredient from tablets. Additionally, high scattered values at the first time point were observed from dissolution profiles at 50 rpm in comparison with 75 rpm. (Fig.2)

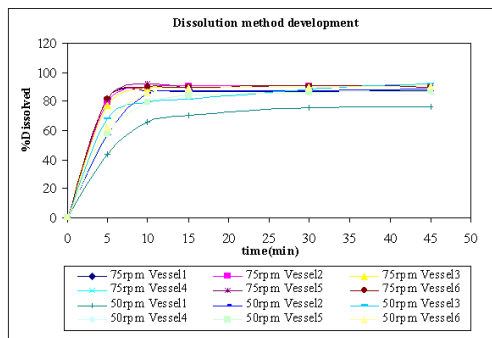


Figure2. Dissolution profile with 75rpm and 50 rpm results per vessel

Table1. RSD values at first time point from dissolution profiles with 75 rpm and 50 rpm

rpm	RSD after 5 min (%)
50rpm	22.33
75rpm	2.90

Increased rotation speed at 75 rpm and 100 rpm gave higher results, potentially as a result from reduced coning, which on the other hand gives greater exposure of drug component to the dissolution medium. Useful information about the influence of hydrodynamics was gathered when **Infinity time point test** was performed, with increase of paddle speed at 250 rpm for additional 30 minutes. The results were close to 100%, and although 100% dissolution is not a regulatory requirement the dissolution at the infinity point gave prove that higher agitation increases the dissolution rate.

Table2. Dissolution end point test results with different rpm

Dissolution test End point	Released active component after 30 minutes (%)
50 rpm	80.78
75 rpm	91.41
100 rpm	96.36
250 rpm	100.08*

* (after 60 minutes)

b) Influence of different type of apparatus

Additionally, Apparatus I (basket) was evaluated at 100 rpm [3]. Although the results revealed that the use of baskets increases the dissolution rate, further experiments demonstrated that baskets have lower discriminatory abilities.

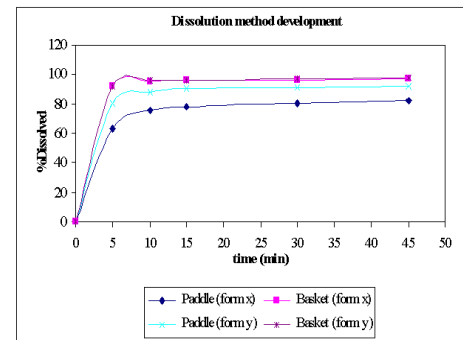


Figure3. Dissolution profiles on trials with different polymorphic forms performed with Apparatus (I)-100rpm and Apparatus (II)-75rpm

In general, lower rotation speed demonstrated lack of robustness, while higher rotation speeds showed lack of discriminatory power.

CONCLUSION

Based on all experiments performed, a specification dissolution method was established which employs Apparatus II (paddle) [4], 75 rpm and buffer pH 6.8 as optimal test conditions for evaluation of the specific compound. During development of the dissolution method the right choice of conditions for performance of the test is of the utmost importance to reflect the product performance from quality as well as regulatory aspect.

REFERENCES

1. FDA, CDER 1995. SUPAC-IR: Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Scale-Up and Post-Approval Changes: Chemistry, Manufacturing and Controls, In Vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation
2. European Pharmacopoeia 6th Edition 2009 Supplement 6.8. Chapter 5.17.1. Recommendations on dissolution testing Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe: Germany 2009.
3. United States Pharmacopoeia, USP 32, National Formulary 27. General Chapter 1092 : The dissolution procedure: Development and Validation; United States Pharmacopoeial Convention: Rockville, MD, 2009.
4. European Pharmacopoeia 6th Edition 2009 General Chapter 2.9.3. Dissolution Test for Solid Dosage Forms; Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe: Germany 2009.

ИСПИТУВАЊЕ НА ХИДРОДИНАМИЧКИТЕ ЕФЕКТИ ВРЗ ТЕСТОТ ЗА ДИСОЛУЦИЈА НА VCS КЛАСА II АКТИВНА КОМПОНЕНТА ФОРМУЛИРАНА КАКО ЦВРСТА ДОЗАЖНА ФОРМА СО БРЗО ОСЛОБОДУВАЊЕ

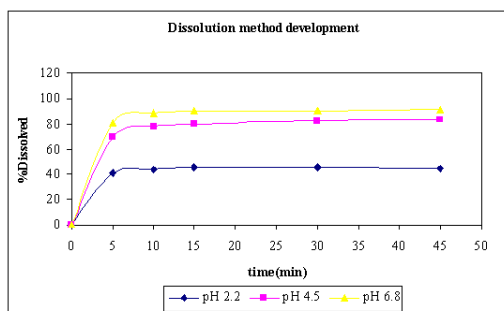
Ирена Брашнарска, Наташа Каралија, Сузан Мемед-Сејфулах, Сања Симеоновска, Ѓорѓи Петрушевски, Ема Киковска-Стојановска, Билјана Шапкарева, Соња Угарковиќ

Истражување и развој, АЛКАЛОИД АД, Александар Македонски 12, 1000 Скопје, Република Македонија

ВОВЕД

In vitro тестот за дисолуција во последните декади во развојот на нови производи се издвои како значајна физичко-хемика алатка за одредување на фармацевтскиот квалитет и предвидување на биорасположливоста на производот. Развојот на методата за дисолуција претставува континуиран процес кој мора да ги прати промените како што се менува производот. Специфични информации за лековитата супстанца како нејзината растворливост, pK_a , стабилноста како функција од pH и VCS класата го водат истражувачкиот тим кон развој на дискриминаторен метод за дисолуција, специфичен за секој производ. Различни брзини на ротација, различни медиуми и различни апарати за дисолуција треба да се евалуираат за да се дефинира метод за дисолуција кој ќе даде вистинска слика за перформансите на производот, но истотака ќе има доволна дискриминаторна моќ да ги детектира промените во формулацијата.

Евалуирани беа филм обложени таблети со брзо ослободување со активна компонента од VCS Class II (ниска растворливост, висока пермеабилност) и pK_a вредност од ~ 4.5 [1]. Активната компонентата има pH зависна растворливост и порастот на pH ја подобрува нејзината растворливост, а со тоа и брзината на дисолуција, посебно кога $pH > pK_a$ на компонентата. Растворливоста на лековитата супстанца е одредена со shake-flask метода во три различни медиуми. Добиени се следниве вредности 0.00385mg/ml, 0.0113mg/ml и 0.143mg/ml за pH 2.2, pH 4.5 и pH 6.8, соодветно. Активната компонента е целосно јонизирана и брзо растворлива во интестиналниот регион со pH ~6.5. Следствено, изборот на фосфатен пуфер pH 6.8 [2] како медиум за дисолуција претставува физиолошки избран медиум, во склад со регулаторните барања.



Слика 1. Дисолуциони профили од медиуми со различно pH

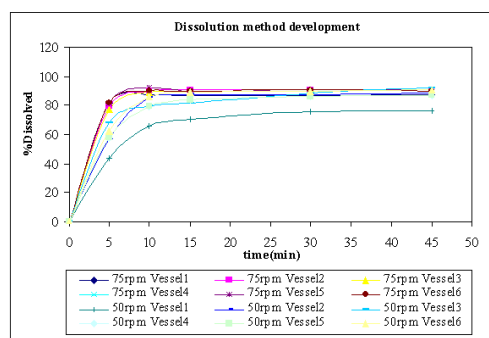
МЕТОДИ И МАТЕРИЈАЛИ

Квантификација на процентот на ослободена активна компонента беше направена со HPLC метода со UV детекција на 246 nm, инструмент VWR Hitachi Elite LaChrom. Сепарацијата е изведена на RP Select B 125 x 4.0mm 5µm колони. Тестот за дисолуција е изведен на Varian VK 7025 тестер за дисолуција со Apparatus I (basket) и Apparatus II (paddle). Одбрани временски точки за дисолуциони профили се 5, 10, 15, 30 и 45 минути, додека за тест во крајна точка е одбрана 30-тата минута. Во експериментални цели користени се квантитативно пропорционално формулирани филм-обложени таблети со различна дозажна јачина, произведени со ист производен процес.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

а) Влијание на брзина на вртежи

Со варирање на брзината на вртежи се евалуира ефектот од хидродинамиката на брзината на ослободување на активната компонента од формулацијата. Евалуација на влијанието на различните брзини на ротација беше изведена со тестови во крајна точка со 50 rpm, 75 rpm и 100 rpm. Брзината од 50 rpm резултираше со формирање на купа, кое води кон нецелосно ослободување на активната компонента од таблетите. Дополнително беше забележана преголема варијабилност во првата временска точка од профилот со 50 rpm споредено со 75 rpm.



Слика 2. Дисолуциони профили со 75 и 50 rpm; резултати по чаша

Табела 1: RSD во првата временска точка од дисолуциони профили со 75rpm и 50rpm

rpm	RSD после 5 min (%)
50rpm	22.33
75rpm	2.90

Со зголемување на брзината на 75 rpm и 100 rpm се подобрија резултатите, заради можно намалување на формираната купа, со што има поголемо изложувањето на компонентата на медиумот. Корисна информација за влијанието на хидродинамиката се доби со изведба на **Infinity time point test - Тест во бесконечна точка** со зголемување на брзината на веслото на 250 rpm, за дополнителни 30 минути. Резултатите беа блиску до 100.0% и иако не постои регулаторно барање за 100.0% растворливоста во бесконечна точка докажа дека со поголема брзина на вртежи се зголемува растворливоста.

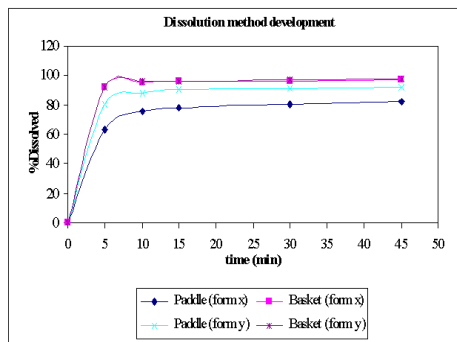
Табела 2. Резултати од тест на дисолуција во крајна точка со различни rpm

Тест на дисолуција во крајна точка	Ослободена активна компонента после 30 min (%)
50 rpm	80.78
75 rpm	91.41
100 rpm	96.36
250 rpm	100.08*

*(после 60min)

б) Влијание на вид на апарат

Дополнително, евалуиран е Apparat I (корпи) со 100 rpm [3]. Беше докажано дека корпите ја зголемуваат дисолуцијата, но со понатамошни експерименти беше потврдено дека не се доволно дискриминаторни.



Слика 3. Дисолуциони профили на проби со различни полиморфни форми изведени на Апарат (I) 100rpm и Апарат (II) 75rpm Генерално, помалите брзини покажаа недостаток од робустност, додека за поголемите брзини беше докажано дека немаат доволна дискриминаторна моќ.

ЗАКЛУЧОК

Базирано на сите претходно наведени експерименти беше поставен спецификациски метод за дисолуција кој вклучува Apparat II (paddle) [4], 75 rpm и пуфер рН 6.8 како најоптимални услови за евалуација на специфичната активна компонента. За време на развој на методата за дисолуција од пресудно значење е правилниот избор на условите на изведување на тестот за истиот да ја рефлектира вистинска слика за производот како од аспект на квалитет така и од регулаторен аспект.

ЛИТЕРАТУРА

- 1, FDA, CDER 1995. SUPAC-IR: Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Scale-Up and Post-Approval Changes: Chemistry, Manufacturing and Controls, In Vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation
- 2, European Pharmacopoeia 6th Edition 2009 Supplement 6.8. Chapter 5.17.1. Recommendations on dissolution testing Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe: Germany 2009.
- 3, United States Pharmacopoeia, USP 32, National Formulary 27. General Chapter 1092 : The dissolution procedure: Development and Validation; United States Pharmacopoeial Convention: Rockville, MD, 2009.
- 4, European Pharmacopoeia 6th Edition 2009 General Chapter 2.9.3. Dissolution Test for Solid Dosage Forms; Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe: Germany 2009.

HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF DICLOFENAC SODIUM AND ITS IMPURITIES USING "CORE-SHELL" TECHNOLOGY

M. Hadzieva, L.Ugrinova, N. Nakov, K. Brezovska, A. P. Panovska, S. T. Jolevska, A. Dimitrovska

Center for drug quality control, Faculty of Pharmacy, University Ss. Cyril and Methodius, Skopje, Macedonia

INTRODUCTION

Diclofenac Sodium belongs to a group of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs), and is routinely used in treatment of rheumatoid arthritis and various pains [1].

The monograph of Diclofenac Sodium in the current edition of European pharmacopoeia (Ph.Eur.) specifies five impurities: A, B, C, D and E. The determination of these impurities is performed by HPLC method, using LC column packed with 5 µm, end-capped octylsilyl silica gel (C8), size 250 x 4.6 mm. The analysis time to separate the impurities of diclofenac with required chromatographic resolution is too long (35 minutes) [2].

Recent developments in liquid chromatography (LC) are focused in obtaining HPLC columns with higher efficiency and increased resolution in less analysis time. For that purpose, shorter columns packed with smaller particle size (3 µm and sub-2 µm) have been introduced in LC. These columns generate high pressures which exceeds the limits of standard HPLC equipment, thus requiring the use of ultra high pressure HPLC systems [3].

Recently HPLC columns based on a core shell technology have been developed in order to obtain ultra high efficiency, on standard HPLC instruments. Core shell particles (also called fused-core™ particles, shell particles or controlled-surface-porosity particles) consist of a non porous silica core and a narrow shell of porous silica [4]. The thin porous layer minimizes the analyte diffusion path and improves the mass transfer of the analytes significantly, resulting in higher column efficiency, without affecting the chromatographic resolution, when compared to fully porous silica columns [4]. The increased efficiency provides an immediate benefit on sensitivity, making it easier to detect low level impurities in comparison to traditional LC columns [3].

The aim of this work is to develop HPLC method for simultaneous determination of Diclofenac Sodium and its impurities in pharmaceutical preparation (eye solution, gel), using the advantages of core-shell technology.

EXPERIMENTAL

Standard solutions:

Diclofenac sodium, standard substance, was dissolved in methanol and diluted with water to final concentration of 1 mg/ml.

Standard solutions of all impurities were prepared individually and in a mixture by dissolving the impurities, standard substances, in methanol and diluting with water to final concentration of 2 mg/ml each.

Sample solutions:

Eye solution (0.1% diclofenac sodium): The commercially available eye solution 0.1% was used directly, without dilution.

Gel formulation (1% diclofenac sodium) was diluted to final concentration of diclofenac sodium 0.1%.

Chromatographic conditions

Experiments were made on Agilent 1200 LC System. The separation was performed on Kinetex™ (Phenomenex, Inc) core-shell column C18 100 x 4.6 mm 2.6 μm, using buffer (1.04 g/L NaH₂PO₄·2H₂O, pH 2,5) and methanol (60/40, v/v) as a mobile phase. The column temperature was 30°C. Flow rate was 2.3 ml/min. Injection volume was 20 μl. UV detection was performed at 254 nm.

RESULT AND DISCUSSION

Under the proposed chromatographic conditions, satisfactory separation ($R_s > 2$) of the obtained peaks was achieved in total analysis time of 6 minutes (Table 1). The resolution between the peaks from diclofenac sodium and impurity A is approximately 16 (the requirement of Ph.Eur is at least 6.5).

Table 1. Results from system suitability of the method

	Imp.E	Imp.A	Imp.C	Diclof.	Imp.B	Imp.D
k'	0.53	3.91	6.47	9,01	10.08	12.71
N	1204	6391	8742	10195	12501	11571
Rs		15.97	9.07	7.08	2.70	5.79
RSD% (n=6)						
RT	0.06	0.05	0.08	0.05	0.05	0.09
AUC	0.10	1.65	1.34	1.08	0.58	0.25

N-theoretical plates, k'-capacity factor, Rs-resolution with preceding peak, RT-retention time, AUC-peak area

The obtained numbers of theoretical plates for all of the peaks indicate a good separation efficiency of the column. The precision of the system was confirmed by the repeatability of the retention times and peak area (RSD % < 2.0%).

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were determined from the residual standard deviation of the regression line (s) and the slope (S) [5]. The obtained results for LOD ($3.3\sigma/S$) and LOQ ($10\sigma/S$) indicate a good sensitivity of the method (Table 2).

Table 2. LOD and LOQ for the impurities

	LOD (μg/ml)	LOQ (μg/ml)
Imp.A	0.09	0.28
Imp.B	0.02	0.06
Imp.C	0.04	0.11
Imp.D	0.06	0.19
Imp.E	0.03	0.10

Applicability of this method for determination of diclofenac sodium and its impurities in pharmaceutical preparations was evaluated by analyzing the samples of commercially available eye solution and gel formulation (Fig. 1 and Fig. 2).

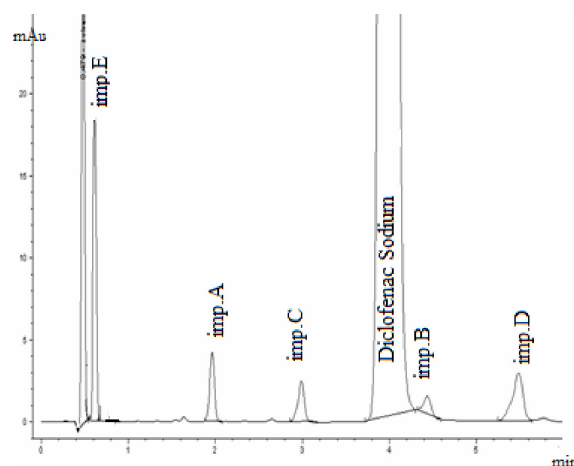


Fig. 1 Chromatogram of sample solution from Eye solution

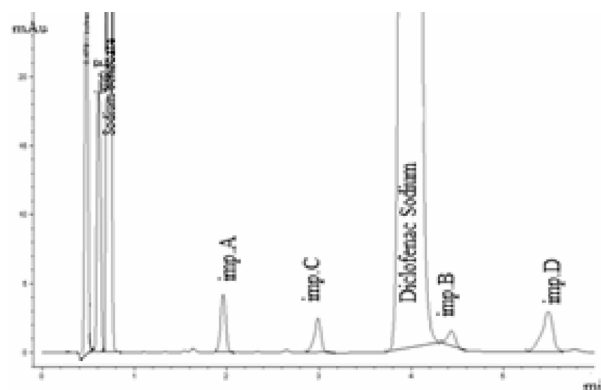


Fig.2 Chromatograms of the sample solution from gel

In the chromatograms of placebo solutions for both formulations no interference with the peaks were observed indicating the specificity of the method.

CONCLUSION

A simple and rapid reverse phase HPLC method for determination of Diclofenac Sodium and its impurities using core shell technology for stationary phase was developed. The method is sensitive, selective and specific and can be used for analysis of pharmaceutical preparations containing diclofenac sodium.

REFERENCES

1. Salmann, AR The history of Diclofenac .Am.J.Med.80,4B:29-33
2. European Pharmacopeia 7.0 (2011), Council of Europe (EDQM), Strasbourg, France pp. 1830-1831
3. L.Snyder, J.Kirkland, J.Dolan, Introduction to modern liquid chromatography John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, Canada 3th ed. (2010) pp. 202
4. Error! Hyperlink reference not valid.
5. International Conference on Harmonization (1996), ICH Harmonized Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), Geneva, Switzerland

HPLC МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ДИКЛОФЕНАК НАТРИУМ И НЕГОВИТЕ ОНЕЧИСТУВАЊА СО ПРИМЕНА НА „CORE-SHELL“ ТЕХНОЛОГИЈА

М. Хаџиева, Л. Угринова, Н. Наков, К. Брезовска, А. Поцева Пановска, С. Трајковиќ Јолевска, А. Димитровска

Центар за испитување и контрола на лекови, Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, Македонија

ВОВЕД

Диклофенак натриум припаѓа во групата на нестероидни антиинфламаторни лекови и рутински се користи за третман на реуматоиден артритис и болки од различна природа [1]. Во монографијата на диклофенак натриум во Европската фармакопеја (Ph.Eur), се специфицирани пет онечистувања: А, В, С, D и Е. Нивното определување се врши со HPLC метод, со примена на октилсилил силика гел како стационарна фаза (C8) со димензии 250 x 4,6 mm. Времето на анализа потребно да се постигне задоволителна резолуција, согласно со барањата на фармакопејата изнесува 35 минути [2].

Во последните години истражувањата во течната хроматографија се насочени кон добивање на HPLC колони со поголема ефикасност и зголемена резолуција. За таа цел, се воведени пократки колони со помали честички (3 μ m и суб-2 μ m). При работа со овие колони се создаваат високи притисоци кои ги надминуваат границите на стандардната HPLC опрема, што бара употреба на UPLC системи [3].

Неодамна се развиени HPLC колони, базирани на „core shell“ технологија со цел да се добие ултра висока ефикасност на стандардни HPLC инструменти. „Core-shell“ честичките (исто така наречени „fused-Core“™ честички, „shell“ честички или честички со контролирана порозност на површината) се состојат од цврсто јадро и порозна обвивка [4]. Тенкиот порозен слој го минимизира патот на дифузија и значително го подобрува трансферот на маса, што резултира со поголема ефикасност на колоната, без да се влијае на хроматографската резолуција, а истовремено се обезбедува зголемена осетливост, во споредба со традиционалните колони [3,4].

Целта на овој труд е да се развие HPLC метод за истовремено определување на диклофенак натриум и на неговите онечистувања во фармацевтски дозирани форми (капки за око, гел), со примена на HPLC колона базирана на „core-shell“ технологијата на полнење.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ

Стандардни раствори:

Диклофенак натриум, стандардна супстанција, е растворен во метанол и разреден со вода до крајна концентрација 1 mg/ml.

Стандардните раствори на сите онечистувања се подготвени поединечно и во смеса со растворање на онечистувањата, стандардни супстанции, во метанол и разредување со вода до крајна концентрација 2 mg/ml за секое онечистување.

Пробен раствор:

Капки за око (0,1% диклофенак натриум): комерцијално достапен 0,1% раствор е користен директно, без разредување. Гел (1% диклофенак натриум): примерок од готовиот препарат е

растворен и разреден со вода до крајна концентрација на диклофенак натриум: 0,1%

Хроматографски услови

Испитувањата се спроведени на Agilent 1200 LC систем, со примена на Kinetex™ (Phenomenex, Inc) „core-shell“ C18 колона со димензии 100 x 4,6 mm 2,6 μ m, користејќи пуфер (1.04 g/l NaH₂PO₄·2H₂O, pH 2,5) и метанол (60/40, v/v) како мобилна фаза. Температурата на колоната е 30°C. Протокот е 2,3 ml/min. Волуменот на инјектирање е 20 μ l. UV детекцијата е на 254 nm.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Со примена на предложените хроматографски услови, за време од 6 минути е постигнато задоволително разделување (Rs > 2) на добиените пикови (Табела 1). Резолуцијата помеѓу диклофенак натриум и онечистувањето А е околу 16 (според барањата на Ph.Eur треба да изнесува најмалку 6,5).

Табела 1. Резултати од соодветноста на системот

	Imp.E	Imp.A	Imp.C	Diclof.	Imp.B	Imp.D
k'	0.53	3.91	6.47	9,01	10.08	12.71
N	1204	6391	8742	10195	12501	11571
Rs		15.97	9.07	7.08	2.70	5.79
RSD% (n=6)						
RT	0.06	0.05	0.08	0.05	0.05	0.09
AUC	0.10	1.65	1.34	1.08	0.58	0.25

N-теоретски подови, k' -фактор на капацитет, Rs-резулција со претходниот пик, RT-ретенционо време, AUC-површина под пик

Добиените вредности за теоретските подови за сите пикови укажуваат на добро разделување на компонентите и задоволителна ефикасност на колоната. Прецизноста на системот е потврдена со повторливоста на ретенционото време и на површината под пик (RSD% < 2,0%).

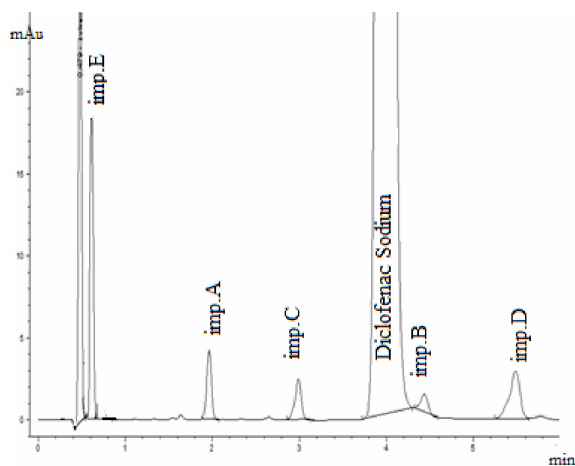
Лимитот на детекција (LOD) и лимитот на квантификација (LOQ) се определени од резидуалната стандардна девијација (s) и наклонот (S) на регресионата права [5]. Добиените резултати за LOD (3.3s/s) и LOQ (10s/s) укажуваат на добра осетливост на методот (Табела 2).

Табела 2. LOD и LOQ за сите онечистувања

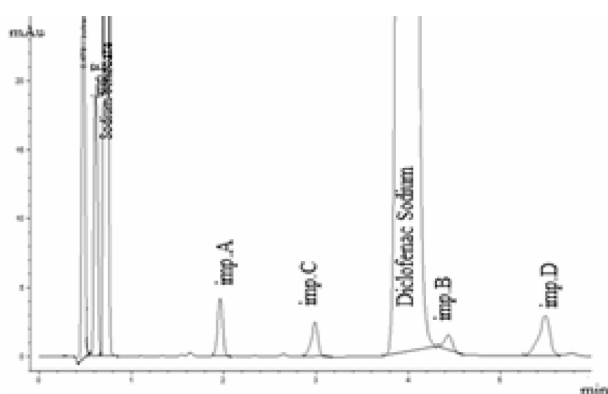
	LOD (μ g/ml)	LOQ (μ g/ml)
Imp.A	0.09	0.28
Imp.B	0.02	0.06
Imp.C	0.04	0.11
Imp.D	0.06	0.19
Imp.E	0.03	0.10

Предложениот метод е применет за анализа на примероци од комерцијално достапни капки за око и гел (Слика 1 и Слика 2).

Слика 1. Хроматограм на пробниот раствор од капки за око



Слика 2. Хроматограм на пробниот раствор од гел



На хроматограмите од плацебо растворите за двете формулации не се забележани интерферирачки пикови што ја потврдува специфичноста на методот.

ЗАКЛУЧОК

Развиен е едноставен и брз HPLC метод за определување на диклофенак натриум и неговите нечистувања со примена на колона базирана на „core-shell“ технологија. Методот е осетлив, селективен и специфичен и може да се применува за анализа на фармацевтски препарати што содржат диклофенак натриум.

ЛИТЕРАТУРА

1. Salmann, AR The history of Diclofenac .Am.J.Med.80,4B:29-33
2. European Pharmacopeia 7.0 (2011), Council of Europe (EDQM), Strasbourg, France pp. 1830-1831
3. L.Snyder, J.Kirkland, J.Dolan, Introduction to modern liquid chromatography John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, Canada 3th ed. (2010) pp. 202
4. Error! Hyperlink reference not valid.
5. International Conference on Harmonization (1996), ICH Harmonized Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), Geneva, Switzerland

HEADSPACE GAS CHROMATOGRAPHY METHOD FOR DETERMINATION OF PROPYLENE GLYCOL

M. Hadzieva, A. Poceva Panovska, K. Brezovska, L. Ugrinova, J. Tonic Ribarska, A. Dimitrovska

Center of drug quality control, Faculty of Pharmacy, "Ss. Cyril and Methodius", University, Skopje, Macedonia

INTRODUCTION

Propylene glycol (propane-1,2-diol) (PG) is an odorless and colorless liquid with wide practical applications. It has good solvent properties for many aromatic compounds and it is miscible with water in all proportion. Due to these characteristics PG is frequently used to increase the solubilization of non-polar pharmaceuticals in aqueous solvents. It can be found as a solvent/co-solvent in many pharmaceutical preparations including oral, parenteral and topical.

Concerning its toxicity PG is generally recognized as safe and it is approved by the FDA (Food and Drug Administration) for use in food, drugs and cosmetics [2]. Although considered harmless, there is reported toxicity in patients receiving large amounts of PG through long term administration of intravenous pharmaceutical preparations. Toxic effects are manifested by metabolic acidosis, cardiac arrhythmias, renal dysfunction, central nervous system disturbances, and hyperosmolarity [1,3].

Quantitative determination of PG is usually required in pharmaceutical preparations where its content is very high (up to 80%). The commonly used analytical method to quantify glycols is based on gas chromatographic separation with flame ionization (FID) or MS detection. Several GC methods require derivatization of propylene glycol prior chromatography [4,5].

The aim of the study was to develop headspace - gas chromatographic (HS-GC) method for determination of PG as a solvent in parenteral preparation with a high content of PG.

EXPERIMENTAL

Chromatographic conditions

Experiments were performed on Perkin Elmer Clarus 500 GC System equipped with a flame ionization detector (FID) using Headspace Turbo matrix sampler (Perkin Elmer). Separation was done on 100% polyethylene glycol capillary column (DB-WAX, 30 m x 0,53mm i.d, 1 μm film thickness, Agilent Technology, Inc.). Operating conditions are given in Table 1 and Table 2.

Table 1 Headspace Conditions

Needle Temperature	145 °C
Transfer line temperature	140 °C
Oven temperature	150 °C
Column Head Pressure	15 psi
Injection Pressure	45 psi
Injection time	0,08 min
Thermostatting time	10 min.
Pressurization time	3 min.

Table 2 Conditions of the gas chromatograph

Oven program	150 °C/ 15 min
Carrier gas	Nitrogen
Flow	3,5 ml/min
Split ratio	1:10
Injector temperature	250 °C
Detector temperature	250 °C

Standards and samples

Stock solution of PG was prepared by dissolving PG in water and diluting to final concentration of 80 mg/ml.

Internal standard stock solution was prepared by dissolving benzyl alcohol (BA) in water and diluting to final concentration of 1,5 mg/ml.

Standard solution: 5 ml of standard stock solution of propylene glycol and 5 ml of internal standard stock solution in 25 ml volumetric flask.

Test solution: 5 ml commercially available concentrate for solution for infusion of α -lipoic acid and 5 ml internal standard stock solution were diluted to 25 ml with water.

Validation of the method

Validation of the method was performed following the International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines and included determination of specificity-selectivity, linearity (40-120 mg/ml), accuracy and precision [6].

RESULTS AND DISCUSSION

A HS-GC FID method for determination of PG as a solvent in parenteral preparation with a high content of PG was developed.

The obtained retention time (RT) of PG was 4.54 min with a good peak shape (Fig 1). The internal standard, BA (RT=11.5, Fig 2) elutes after the PG with complete resolution ($R_s > 2$, Table 3) indicating a good selectivity of the method.

Table 3. Results of system suitability parameters

Parameter	PG	BA
k'	3.08	7.258
Rs	-	18.70
N	2817.1	11019.851
RSD % (n=6)		
RT	0.02	0.09
AUC	1.8	0.96

(N-theoretical plates, k'-capacity factor, Rs-resolution)

The obtained values for repeatability of the retention times and peak areas (AUC) ($RSD \leq 2\%$, $n=6$) confirmed that the system is precise (Table 3). The results obtained from the regression analysis of AUC versus concentration, indicate that the method is linear ($y = 366.68x + 176.83$, $R^2=0.996$).

In the chromatograms obtained from the blank sample and placebo no significant influence of other compounds on quantification was observed, which indicates on the specificity of the method.

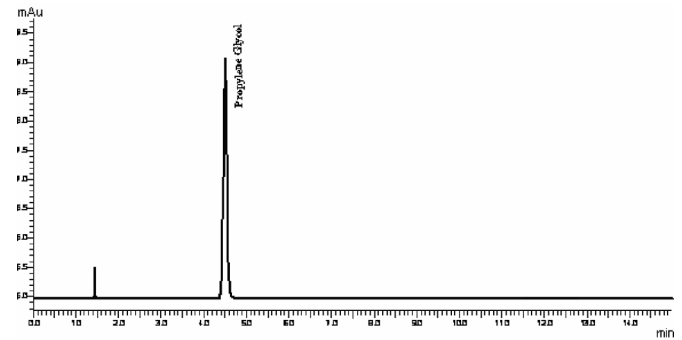


Fig.1 Chromatogram of the standard solution of PG

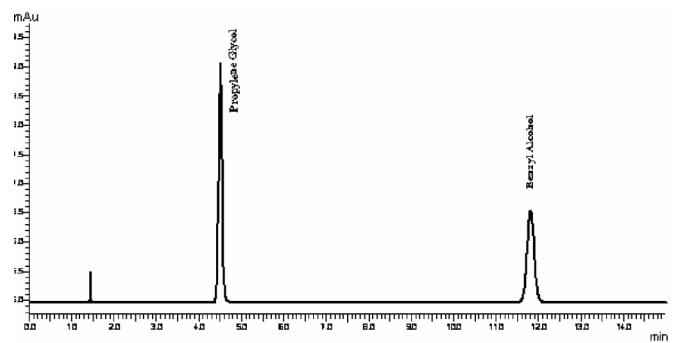


Fig.2 Chromatogram of the test solution

The values for recovery and RSD%, obtained from determination of PG in concentrate for solution for infusion of α -lipoic acid, using method of standard addition, confirmed that the method is accurate and precise in the range of 80% to 120% of the working concentration.

CONCLUSION

A simple, specific, accurate and precise method based on a HS-GC FID was developed for determination of PG as a solvent in parenteral preparation with a high content of PG.

REFERENCES

1. Ali H. Al-Khafaji, MD, William E. Dewhirst, MD, and Harold L. Manning, MD PG Toxicity Associated with Lorazepam Infusion in a Patient Receiving Continuous Venovenous Hemofiltration with Dialysis (2002) Anesth Analg 94:1583-5
2. GRAS (1982) status of propylene glycol and propylene glycol monostearate. FDA. Final rule. Fed. Regist 47 Fed. Regist
3. Esparis B. Osmolar gap metabolic acidosis in a 60year old man treated for hypoxemic respiratory failure (2000) Chest; 118: 545-6
4. Zhu J, Feng YL, Aikawa B A positive chemical ionization GC/MS method for the determination of airborne ethylene glycol and propylene glycols in non-occupational environments (2004) J Environ Monit 6(11):881-887
5. Toxicological profile for Otto Fuel II and its components ,(1995) US Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, pp 139-148
6. International Conference on Harmonization (1996), ICH Harmonized Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), Geneva, Switzerland

МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ПРОПИЛЕН ГЛИКОЛ СО ПРИМЕНА НА „HEADSPACE“ ГАСНА ХРОМАТОГРАФИЈА

М. Хаџиева, А. Поцева Пановска, К. Брезовска, Ј.Тониќ Рибарска, Л. Угринова, А. Димитровска

Центар за испитување и контрола на лекови, Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Водњанска 17, Скопје, Македонија

ВОВЕД

Пропилен гликолот (пропан-1,2-диол) (PG) е безбојна течност, без мирис, која се меша со вода во сите односи и е добар растворувач за многу ароматични соединенија. Поради овие карактеристики PG често се користи за да ја зголеми растворливоста на неполярни лекови во водени растворувачи. Тој се употребува како растворувач/корастворувач во многу фармацевтски препарати вклучувајќи орални, парентерални и препарати за надворешна употреба.

Во однос на неговата токсичност, воглавно се смета за безбеден и е одобрен од Американска Агенција за храна и лекови (FDA) за употреба во храна, лекови и козметика [2]. Иако важи за безбеден, пријавена е токсичност кај пациенти кои примаат големи количини на PG преку долготрајна администрација на препарати за интравенска употреба. Токсичните ефекти се манифестираат со метаболна ацидоза, срцеви аритмии, бубрежна дисфункција, нарушувања на централниот нервен систем и хиперосмоларност [1,3].

Во фармацевтски препарати каде содржина на PG е висока (до 80%) потребно е негово квантитативно определување. Најчесто користен аналитички метод за квантификација на гликоли е гасната хроматографија (GC) со пламен јонизационен (FID) или масен детектор. Некои GC методи користат постапки на дериватизација на PG [4,5].

Целта на овој труд беше да се развие метод за определување на PG како растворувач во парентерални препарати со примена на „headspace“ гасна хроматографија (HS-GC).

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ

Хроматографски услови

Испитувањата се спроведени на Perkin Elmer Clarus 500 GC систем опремен со FID и Headspace Turbo Matrix sampler (Perkin Elmer), користејќи капиларна колона пакувана со 100% полиетилен гликол (DB-WAX, 30 m x 0,53mm i.d, 1 µm ft, Agilent Technology, Inc.). Работните услови се дадени во Табела 1 и Табела 2.

Табела 1. “Headspace” услови

Температура на игла	145 °C
Температура на трансфер линија	140 °C
Температура на печка	150 °C
Притисок на колона	15 psi
Притисок на ињектирање	45 psi
Време на ињектирање	0,08 min
Време на термостатирање	10 min
Време на воведување на притисок во вијалата	3 min

Температурен програм на печка	150 °C/ 15 min
Носечки гас	Азот
Проток	3,5 ml/min
Сплит однос	1:10
Температура на ињекторот	250 °C
Температура на детекторот	250 °C

Табела 2. Услови на гасниот хроматограф

Раствори за апликација

Основен стандарден раствор на PG е подготвен со растворање на PG и разредување со вода до крајна концентрација од 80 mg/ml.

Основен раствор на внатрешен стандард е подготвен со растворање на бензил алкохол (BA) и разредување со вода до крајна концентрација од 1,5 mg/ml.

Стандарден раствор: 5 ml основен стандарден раствор на PG и 5 ml основен раствор на внатрешен стандард се разредуваат со вода до 25 ml.

Пробен раствор: 5 ml комерцијален концентрат за раствор за инфузија на α-липоинска киселина и 5 ml основен раствор на внатрешен стандард се разредуваат со вода до 25 ml.

Валидација на методот

Валидацијата на методот е изведена според водичите на Меѓународна конференција за хармонизација (ICH) и вклучува определување на специфичност/ селективност, линеарност (40-120 mg/ml), точност и прецизност [6].

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Развиен е HS-GC FID метод за определување на PG како растворувач во парентерални препарати со висока содржина на PG.

Добиеното ретенционо време (RT) на PG изнесува 4,54 минути (Слика 1). Внатрешниот стандард, BA (RT = 11,5, Слика 2) елуира по пикот на PG со комплетна резолуција ($R_s > 2$, Табела 3), што укажува на добра селективност на методот.

Табела 3. Резултати од параметрите за соодветност на системот

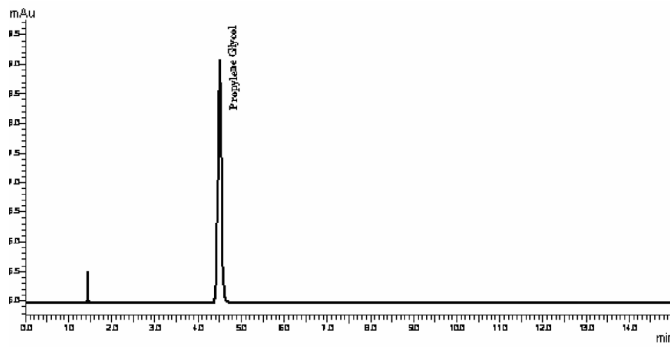
Параметар	PG	BA
k'	3.08	7.258
Rs	-	18.70
N	2817.1	11019.851
RSD % (n=6)		
RT	0.02	0.09
AUC	1.8	0.96

(N-теоретски подови, k' - фактор на капацитет, Rs-резолуција)

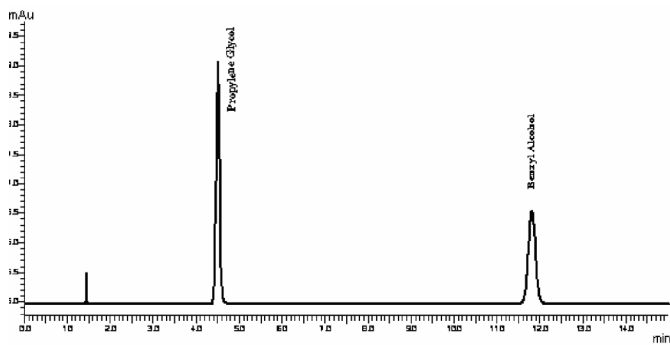
Добиените вредности за повторливоста на ретенционото време и површината под пик (AUC) ($RSD \leq 2\%$, n=6) ја потврдуваат прецизноста на системот (Табела 3).

Резултатите добиени од регресионата анализа на AUC во однос на концентрацијата, укажуваат дека методот е линеарен ($y = 366.68x + 176.83$, $R^2 = 0,996$).

На хроматограмите добиени од слепата проба и плацебото не се забележани интерферирачки пикови кои би влијаеле на квантификацијата на другите компоненти, што укажува на специфичноста на методот.



Слика 1. Хроматограм на стандарден раствор на PG



Слика 2. Хроматограм на пробен раствор

Вредностите за аналитички принос и RSD%, добиени со определување на PG во концентрат за раствор за инфузија на β -липоинска киселина, со метод на стандардни додатоци, потврдуваат дека методот е точен и прецизен во опсег од 80% до 120% од работната концентрација.

ЗАКЛУЧОК

Развиен е метод за определување на PG базиран на HS-GC FID. Методот е едноставен, специфичен, точен и прецизен и може да се користи за определување на PG во фармацевтски препарати за парентерална употреба.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ali H. Al-Khafaji, MD, William E. Dewhirst, MD, and Harold L. Manning, MD PG Toxicity Associated with Lorazepam Infusion in a Patient Receiving Continuous Venovenous Hemofiltration with Dialysis (2002) *Anesth Analg* 94:1583-5
2. GRAS (1982) status of propylene glycol and propylene glycol monostearate. FDA. Final rule. Fed. Regist 47 Fed. Regist
3. R Esparis B. Osmolar gap metabolic acidosis in a 60year old man treated for hypoxemic respiratory failure (2000) *Chest*; 118: 545-6
4. Zhu J, Feng YL, Aikawa B A positive chemical ionization GC/MS method for the determination of airborne ethylene glycol and propylene glycols in non-occupational environments (2004) *J Environ Monit* 6(11):881-887
5. Toxicological profile for Otto Fuel II and its components ,(1995) US Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, pp 139-148
6. International Conference on Harmonization (1996), ICH Harmonized Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), Geneva, Switzerland

TECHNIQUES FOR THE PREPARATION OF BIOLOGICAL SAMPLES: THEORETICAL ASPECTS OF SPE

S. Petrovski, J. Tonic-Ribarska, S. Trajkovic-Jolevska

Faculty of Pharmacy, University "Ss Cyril and Methodius", Skopje, Macedonia

INTRODUCTION

Sample preparation is a procedure used to clean up a sample before analysis and/or to concentrate a sample to improve its detection. When samples are biological fluids such as plasma, serum or urine, this technique is described as bioanalytical sample preparation.

Sample preparation used to be a long step (60% of the work activity and operating cost) in the analysis and is necessary because most analytical instruments cannot accept the matrix directly. Three major goals for sample preparation are to remove interferences from the sample matrix, to concentrate analytes of interest and to improve analytical system performances [1].

To accomplish these goals, the most commonly used techniques for sample preparation are: liquid – liquid extraction (LLE), solid – phase extraction (SPE), solid – phase microextraction (SPME) and stir – bar sorptive extraction (SBSE).

The aim of this paper was to present advantages and disadvantages of solid phase extraction which is the most widely used sample preparation technique in the analysis of active compounds and their metabolites in biological matrices.

MATRIX EFFECT AND SAMPLE PRETREATMENT

The analysis of such samples requires an adequate sample preparation step prior to the separation, detection and quantification. Biological samples cannot usually be injected directly into an analytical system, because of the multitude of substances present in the sample matrix that can potentially interfere with the analysis. These materials include proteins, salts, endogenous macromolecules, small molecules and metabolic by-products [2]. This matrix component can potentially affect of the analyte ionization and can lead to decreased reproducibility and accuracy for an assay. Therefore, analysts need to use a post-extraction spiked matrix blank and compare the results with an analytical standard in solution to determine the influence of the matrix on the analysis [2,3].

Sample pretreatment steps are commonly used to adjust sample pH and/or disrupt protein binding and their removal. For adjustment of pH generally are used either buffers or basic or acidic solutions. When using a blood or plasma sample, protein binding must be disrupted in the sample pretreatment step by the addition of an organic solvent, strong salt solution or a strong acid solution. Presence of metabolic conjugate in urine sample may need to be liberated before adsorption and therefore hydrolysis with strong acids and bases or enzyme hydrolysis with β -glucuronidase must be performed. Dilution may be appropriate to reduce sample viscosity and improve flow characteristics. Centrifugation and filtration are also used in these situations [2,3].

SOLID – PHASE EXTRACTION

Solid – phase extraction (SPE) is nonequilibrium, but exhaustive procedure compared to the other techniques for sample preparation: LLE, SPME and SBSE, which are more complex to perform.

There are two strategies for SPE: first, active substance can be unretained, while matrix interferences are adsorbed (Fig. 1); and the second, active substance can be retained, while matrix interferences are washed through (Fig. 2) [4].

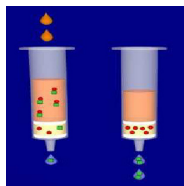


Fig. 1. SPE: Active substance is unretained.

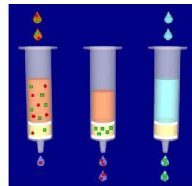


Fig. 2. SPE: Active substance is retained.

Depending on how compounds are retained by the sorbent, there are several retention mechanisms:

- » reversed phase (polar liquid phase, nonpolar modified solid phase). Retention of the analyte are by hydrophobic interactions (nonpolar – nonpolar interactions, van der Waals or dispersion forces);
- » normal phase (nonpolar liquid phase, polar modified solid phase). The analyte is retain on the sorbent by hydrophylic interactions (polar – polar interactions, hydrogen bonding, π – π interactions, dipole – dipole or dipole – induced dipole interactions);
- » ion exchange (anion or cation exchange) (electrostatic attraction of charged group on compound to a charged group on the sorbent's surface) [5].

The basic steps for solid – phase extraction involve (Fig. 3): conditioning/equilibrating the sorbent, loading the sample; washing the sorbent (clean up) and eluting of target analyte [5].

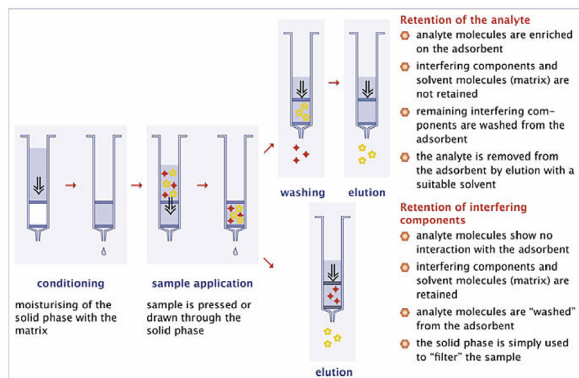


Fig. 3: The basic steps for SPE.

Numerous advantages of the solid – phase extraction technique for sample preparation include: very selective extracts; wide variety of sample matrices accepted; analytes can be concentrated; high recoveries with good reproducibilities; improved throughput via parallel processing; low solvent volumes; suitable for full automation; and no emulsion formation as seen with LLE. Disadvantages such as incomplete removal of interferences, and low stability of the sorbents in base solution, also may be present [2].

CONCLUSIONS

Sample pretreatment including solid – phase extraction procedure is important to ensure efficient detection and quantification of analyte. SPE is a nonequilibrium and exhaustive procedure, which is mostly used for preparation of biological samples.

This technique is simple and effective method to separate groups of compounds with different characteristics. In clinical analysis where drugs are potent and are dosed at low levels, the important criteria of ultra sensitivity, great selectivity and a rugged method point toward solid – phase extraction as the technique of choice for preparation of biological samples.

REFERENCES

1. Hannah White, Presentation of Sample Preparation Strategies for Water Analysis, Waters Corporation, (2007)
2. David A. Wells, High Throughput Bioanalytical Sample Preparation Methods and Automation Strategies, Sample Prep Solutions Company, St.Paul, Minnesota, pp. 41-51, 361-383, (2003)
3. J.Henion, E.Brewer and G.Rule, Anal. Chem. 70 (1998) 650A-656A
4. Patrick D. McDonald, Ph.D.; Edourd S.P. Bouvier, Ph.D., Solid Phase Extraction Applications Guide and Bibliography, A Resource for Sample Preparation Methods Development, Sixth Edition, (1995)
5. Somenath Mitra, Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry, volume 162 (2003), pp. 81-96

ТЕХНИКИ ЗА ПОДГОТОВКА НА БИОЛОШКИ ПРИМЕРОЦИ: ТЕОРЕТСКИ АСПЕКТИ НА SPE

С. Петровски, Ј. Тониќ-Рибарска, С.Трајковиќ-Јолевска

Фармацевтски факултет, Универзитет "СвКирил и Методиј", Скопје, Македонија

ВОВЕД

Подготовката на примерокот за анализа е постапка што се користи за прочистување на примерокот пред анализа и/или да се концентрира аналитот присутен во примерокот со цел да се подобри неговата детекцијата. Кога примероците за анализа се биолошки течности како на пример: плазма, серум или урина, оваа постапка се нарекува подготовка на примероци за биоаналитички испитувања.

Подготовката на примерокот претставува долг процес (60% од активоста и трошокот за вкупната хемиска анализа) и е особено важен, бидејќи кај најголемиот дел од аналитичките инструменти што се користат за определување, примерокот за анализа не може да биде директно аплициран во системот. Подготовката на примерокот има три основни цели: отстранување на интерференциите кои може да бидат присутни во матрицот, концентрирање на аналитите од интерес и подобрување на перформансите на аналитичкиот систем [1].

Најчесто користени техники за подготовка на примероци се: течно – течна екстракција (LLE), цврсто – фазна екстракција (SPE), цврсто – фазна микроекстракција (SPME) и екстракција со сорпциска мешалка (SBSE).

Целта на овој труд е да се изнесат предностите и недостатоците на цврсто-фазната екстракција, како најчесто употребувана техника за подготовка на биолошки примероци за анализа на активната компонента и метаболитите.

МАТРИКС ЕФЕКТ И ПРЕДТРЕТМАН НА ПРИМЕРОКОТ

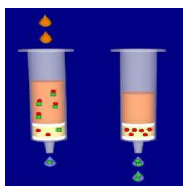
При анализа на биолошки примерок потребна е соодветна подготовка на примерокот пред разделувањето, детекцијата и определувањето. Биолошките примероци најчесто не може да бидат директно инјектирани во аналитичкиот систем, поради присуството на интерферирачки супстанции во матрицата. Како интерферирачки супстанции се јавуваат: протеини, соли, ендогени макромолекули, мали молекули и метаболни продукти [2]. Овие компоненти може да влијаат на јонизацијата на аналитите и може да доведат до намалување на репродукцибилноста и точноста на резултатите. Поради тоа, неопходно е да се определи влијанието на матрицата врз аналитичкиот одговор [2,3].

Подготовката на примерокот пред екстракција, најчесто се изведува за дотерување на рН на примерокот и/или за раскинување на врските на аналитите со протеините. За дотерување на рН обично се користат пуфери или базни/кисели раствори. Доколку примерок за анализа е плазма или крв, врската на аналитот со протеините треба да се раскине во предтретманот на примерокот, и тоа со додавање на органски растворувач, раствори на соли (исолување) или раствор на јака киселина. Доколку во примероци од урина се присутни метаболни коњугати, потребно е да се изврши нивна хидролиза со силни киселини или бази или ензимска хидролиза со β -глюкуронидаза. Намалување на вискозноста на примерокот и подобрување на проточните особини може да се постигне со разредување, центрифугирање и/или филтрација [2,3].

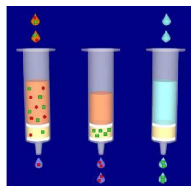
ЦВРСТО – ФАЗНА ЕКСТРАКЦИЈА

SPE претставува нерамнотежна, но потполна постапка во споредба со другите техники кои што се користат за подготовка на примероците за биоаналитички испитувања: LLE, SPME и SBSE, кои воедно се и посложени техники за работа.

Постојат два начина за изведување на цврсто фазната екстракција: адсорпција на интерферирачките компоненти од матрицата на сорбентот (Сл.1); и адсорпција на активната супстанција на сорбентот (Сл.2) [4].



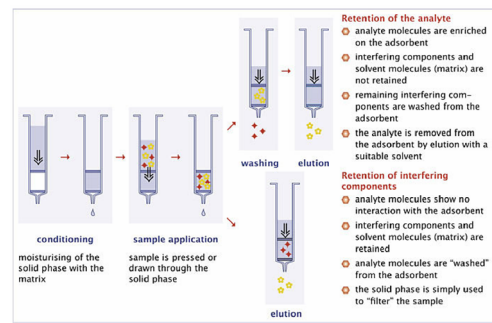
Сл. 1. SPE: Активната супстанца не се задржува на сорбентот



Сл. 2. SPE: Активната супстанца се задржува на сорбент.

Во зависност од начинот на кој компонентите се адсорбираат на површината на сорбентот, постојат неколку механизми на ретенција:

- » реверзно фазна: ретенцијата на аналитот се врши преку хидрофобни интеракции (неполарно – неполарни интеракции, van der Waals–ови сили или сили на дисперзија);
- » нормално фазна: аналитот се адсорбира на сорбентот по пат на хидрофилни интеракции (поларно – поларни интеракции, водородни врски, π - π интеракции, дипол – дипол или дипол – индуциран дипол интеракции);
- » јонска размена (електростатско привлекување на наелектризираните групи на аналитот кон спротивно наелектризираните групи на површината од сорбентот).



Сл. 3: Основни чекори за SPE.

Основните чекори за SPE вклучуваат: кондиционирање на сорбентот, полнење на колоната со примерокот за анализа, миеење и елуирање на аналитот [5]. (Сл. 3)

Многубројните предности на SPE, како техника за подготовка на примероци за анализа, вклучуваат: широк спектар на матрикси што може да се обработат, концентрирање на аналитите, висок аналитички принос со добра репродукцибилност, можност за апликација и анализа на повеќе примероци истовремено, употреба на мали волумени на растворувачи, можност за целосна автоматизација на процесот и не се формираат емулзии како кај LLE. Меѓутоа, покрај бројните предности, SPE има и неколку недостатоци, како што се нецелосно отстранување на интерферирачките супстанции и малата стабилност на сорбентот во базни раствори [2].

ЗАКЛУЧОК

Подготовката на биолошки примероци за анализа, со примена на цврсто – фазна екстракција, е важна постапка со која се обезбедува добивање точни и прецизни резултати во биоаналитичките испитувања

SPE претставува нерамнотежна и потполна постапка што е најчесто употребувана за подготовка на биолошки примероци.

Оваа техника е едноставен и ефикасен метод за разделување на компоненти со различни карактеристики. Во клиничките студии каде лековите се потентни и се дозираат во многу ниска концентрација, критериумите на висока осетливост и одлична селективност на методот се основа што ја прават цврсто – фазната екстракција техника од избор за подготовка на биолошки примероци.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hannah White, Presentation of Sample Preparation Strategies for Water Analysis, Waters Corporation, (2007)
2. David A. Wells, High Throughput Bioanalytical Sample Preparation Methods and Automation Strategies, Sample Prep Solutions Company, St.Paul, Minesota, pp. 41-51, 361-383, (2003)
3. J.Henion, E.Brewer and G.Rule, Anal. Chem. 70 (1998) 650A-656A
4. Patrick D. McDonald, Ph.D.; Edourd S.P. Bouvier, Ph.D., Solid Phase Extraction Applications Guide and Bibliography, A Resource for Sample Preparation Methods Development, Sixth Edition, (1995)
5. Somenath Mitra, Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry, volume 162 (2003), pp. 81-96

FORCED DEGRADATION STUDY ON CLOPIDOGREL 75 mg FILM COATED TABLETS AS USEFUL TOOL DURING ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT

Ksenija Brzilova, Ana Georgieva, Elena Kazandzievska, Gjorgji Petruševski, Suzan Memed-Sejfulah, Sanja Simeonovska, Biljana Šapkareva, Sonja Ugarkovic

Research and Development, ALKALOID AD, Aleksandar Makedonski 12, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

INTRODUCTION

Clopidogrel is active pharmaceutical ingredient which belongs to the group of platelet aggregation inhibitors used to inhibit blood clots in coronary artery disease, peripheral vascular disease and cerebrovascular disease.

In the literature, four impurities of Clopidogrel have already been identified: Clopidogrel related compound A, positional stereo isomers of Clopidogrel named as Clopidogrel related compound B1 and B2, and chiral isomer of Clopidogrel named as Clopidogrel related compound C.

AIM OF THE STUDY

The purpose of this forced degradation study was to challenge the ability of the analytical method, enclosed in USP monograph for Clopidogrel tablets, to separate, detect, identify and quantify degradation products formed when film coated tablets were exposed on several different stress conditions.

EXPERIMENTAL

Clopidogrel 75 mg film coated tablets were exposed at the following stress conditions:

- » *photolytic degradation* [2] (illumination of 1.2 million lux hours for 7 hours; integrated near ultraviolet energy of 200Wh/m² for 3hours; and then exposed to five times increased irradiance dose for 35hours);
- » *thermal degradation* (105°C for 120hours);
- » *temperature and humidity degradation* (40°C and 75%RH for 50days).

HPLC method was used for determination of degradation products:

- » Column: Ultron ES-OVM Chiral, 150mm x 4.6mm i.d.; 5µm;
- » Detection: UV-220nm;
- » Mobile phase A: Phosphate buffer containing 1.36g KH₂PO₄ in 1000ml H₂O;
- » Mobile phase B: Methanol;
- » Isocratic elution;
- » Waters Alliance HPLC system, with PDA Detector.

RESULTS AND DISCUSSION

The obtained results are presented in the Table 1.

Table 1. Obtained data for the control and stressed sample of Clopidogrel 75 mg film-coated tablets.

	Unknown (RRT=0.3)	Clop. Related Comp. A	Clop. Related Comp. B	Clop. Related Comp. C
Control (untreated)	0.11%	0.13%	0.02%	0.47%
Photolytic degradation	0.11%	0.14%	0.02%	0.49%
Thermal degradation	1.36%	0.48%	0.02%	3.82%
Thermal/ Humidity degradation	0.38%	2.68%	0.02%	0.83%

It can be seen that the biggest amount of the degradation products was formed during the thermal degradation. On the other hand, it can be noticed that thermal degradation study was performed at extreme external stress stimuli, notably different than the real environmental condition on which the finished product can be exposed. Therefore, it can be concluded that the main degradation of active pharmaceutical ingredient Clopidogrel is generated when film coated tablets are exposed to higher temperature and humidity levels. This stress condition causes growing of the amount of the known impurities Clopidogrel Related Compound A and Clopidogrel Related Compound C. It can be also seen that there is a significant growth of the amount of the unknown impurity with relative retention time around 0.3. The literature data [1] suggests that this impurity is oxidation impurity of the active substance.

UV and Mass spectroscopy characterization of the unknown impurity was performed by LC-DAD-ESI-MS. The obtained UV and Mass spectra were compared with the corresponding UV and Mass spectra presented in the literature [1] and it was found that they are identical. Small portion of this impurity was synthesized according to the molecular structure found in the literature, having chemical name 5-[1-(2-chlorophenyl)-2-methoxy-2-oxoethyl]-6,7-dihydrothieno [3,2-c]pyridine-5-ium. The comparison of the spectral data, regarding the unknown impurity, obtained from the forced film coated tablet's specimen and the synthesized example, confirmed the identity of this compound, having relative molecular mass of 320.

The purity of the obtained peak of Clopidogrel in this forced degradation study was also checked. Since the purity angle value was lower than the purity threshold value, it was shown that the Clopidogrel peak was pure, with no peaks beneath it.

CONCLUSION

It is concluded that HPLC method used for determination of related and degradation products in the finished product has shown good selectivity and is stability indicating. This HPLC method can be used in determination of potential known and unknown impurities which can be formed during the degradation process of active pharmaceutical ingredient Clopidogrel bisulfate.

REFERENCES

1. A. Mohan, M. Hariharan, E. Vikraman, G. Subbiah, B. R. Venkataraman, D. Saravanan, J. Pharm. Biomed. Anal. 47 (2008) 183-189.
2. Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, (November 1996)

СТУДИЈА НА ЗАБРЗАНА ДЕГРАДАЦИЈА НА CLOPIDOGREL 75 mg ФИЛМ ОБЛОЖЕНИ ТАБЛЕТИ – КОРИСНА АЛАТКА ПРИ РАЗВОЈ НА АНАЛИТИЧКАТА МЕТОДА

Ксенија Брзилова, Ана Георгиева, Елена Казанџиевска, Горѓи Петрушевски, Сузан Мемед-Сејфулах, Сања Симеоновска, Билјана Шапкарева, Соња Угарковиќ

Истражување и развој, АЛКАЛОИД АД, Александар Македонски
12, 1000 Скопје, Република Македонија

ВОВЕД

Clopidogrel е активна фармацевтска супстанца која спаѓа во групата на инхибитори на тромбоцитната агрегација. Во литературата се познати и идентификувани четири онечистувања на Clopidogrel: Clopidogrel Related Compound A, стерео изомерите на Clopidogrel именувани како Clopidogrel Related Compound B1 и B2, и хиралниот изомер Clopidogrel Related Compound C.

ЦЕЛ НА СТУДИЈАТА

Целта на оваа студија на забрзана деградација беше да се испита способноста на аналитичката метода, објавена во USP монографијата за Clopidogrel таблети, да ги одвои, детектира, идентификува и квантифицира деградационите продукти кои се создаваат кога филм обложениите таблети ќе се изложат под влијание на различни надворешни стрес услови.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕТАЛИ

Clopidogrel 75 mg филм обложени таблети беа изложени на следниве стрес услови:

- » фотолитичка деградација [2] (зрачење од 1.2 милиони lux/h во траење од 7 часа, интегрирана УВ енергија од 200Wh/m² во траење од 3 часа, и потоа изложување на пет пати зголемена доза на зрачење во траење од 35 часа);
- » термичка деградација (105°C за време од 120 часа);
- » деградација под влијание на температура и влага (40°C и 75%RH за време од 50 дена).

За детектирање на деградациските производи беше користена HPLC метода:

- » Колона: Ultron ES-OVM Chiral, 150mm x 4.6mm i.d; 5um;
- » Детекција: UV-220nm;
- » Мобилна фаза А: Фосфатен пуфер кој содржи 1.36g KH₂PO₄ во 1000ml H₂O;
- » Мобилна фаза В: Метанол;
- » Изократско елуирање на мобилната фаза;
- » Waters Alliance HPLC систем со PDA детектор.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Добиените резултати се презентирани во Табела 1.

	Непознато Онечистување (RRT=0.3)	Clop. Rel. Comp. A	Clop. Rel. Comp. B	Clop. Rel. Comp. C
Нетретирана проба	0.11%	0.13%	0.02%	0.47%
Фотолитичка деградација	0.11%	0.14%	0.02%	0.49%
Термална деградација	1.36%	0.48%	0.02%	3.82%
Деградација под влијание на температура/ влага	0.38%	2.68%	0.02%	0.83%

Табела 1. Добиени резултати за нетретиран и третиран примерок Clopidogrel 75 mg филм обложени таблети

При изведба на термичката деградација се забележа создавање на најголемо количество на деградациони продукти. Но, бидејќи оваа студија беше изведена под дејство на екстремни стрес услови, кои значително се разликуваат од реалните услови на кои готовиот производ може да биде изложен, не беа земени како релевантни показатели за вистинската деградација. Всушност, беше забележано дека главната деградација на фармацевтски активната супстанца Clopidogrel се случува кога филм обложениите таблети се изложени на влијание на зголемена температура и влага. При овие стрес услови доаѓа до зголемување на количеството на познатите онечистувања Clopidogrel Related Compound A и Clopidogrel Related Compound C. Исто така, беше забележан и значителен пораст на количеството на непознатото онечистување со релативно ретенционо време околу 0.3. Литературните податоци [1] укажуваат дека ова онечистување е оксидациско онечистување на активната супстанца Clopidogrel.

Карактеризацијата на непознатото онечистување беше изведена со изучување на неговиот ултравиолетов (УВ) и масен спектар со помош на LC-DAD-ESI-MS. Добиените УВ и масен спектар беа споредени со соодветните спектри презентирани во литературата [1] и беше заклучено дека тие се идентични. Мало количество од ова онечистување беше синтетизирано, според молекулската структура објавена во литературата (5-[1-(2-хлорофенил)-2-метокси-2-оксоетил]-6,7-дихидритиено [3,2-с]пиридин-5-иум. Идентификација на непознатото онечистување, добиено при форсираната деградација на филм обложениите таблети, беше дополнително изведена преку споредба на неговите спектри и спектрите добиени од синтетизираниот примерок. Беше забележано потполно совпаѓање на спектроскопските податоци за онечистувањето и синтетизираниот примерок. Беше определена и релативната молекулска маса (320) на онечистувањето.

Дополнително, беше проверена и чистотата на добиениот пик на Clopidogrel. Добиената вредност за "purity angle" беше пониска од добиената вредност за "purity threshold", со што се покажа дека пикот на Clopidogrel е чист, односно дека под неговата површина нема други пикови.

ЗАКЛУЧОК

Според податоците добиени од студијата на забрзана деградација беше заклучено дека HPLC методата која се користи за одредување на сродните и деградационите продукти во готовиот производ е селективна и "stability indicating". Методата може да се користи за одредување на потенцијалните познати и непознати онечистувања кои може да се формираат при деградација на активната фармацевтска супстанца Clopidogrel.

РЕФЕРЕНЦИ

1. A. Mohan, M. Mariharan, E. Vikraman, G. Subbaiah, B.R. Venkataraman, D. Saravan "Identification and characterization of a principal oxidation impurity in Clopidogrel drug substance and drug product", ScienceDirect (Декември 2007)
2. Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, (Ноември 1996)

DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF A HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF CLOPIDOGREL-CARBOXYLIC ACID, INACTIVE METABOLITE OF CLOPIDOGREL, IN HUMAN PLASMA

L.Bogdanovska, N.Nakov, J.Acevska, S.Trajkovic-Jolevska, A.Dimitrovska, R. Petkovska

University "Ss Cyril and Methodius", Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

INTRODUCTION

Clopidogrel is a prodrug which is intensively metabolized in the human liver (1). The presence of clopidogrel and its active metabolite in human plasma can not be accurately determined. Therefore, the pharmacokinetic profile of clopidogrel is determined by quantification of the serum concentration of clopidogrel-carboxylic acid (CCA) - the main circulating metabolite which is pharmacologically inactive (2, 3). The quantification of CCA in human plasma can be performed by several GC-MS, LC-MS and HPLC methods (4).

The aim of our study was to optimize and validate RP-HPLC method with UV detection for determination of clopidogrel-carboxylic acid (CCA) in human plasma.

MATERIALS AND METHODS

CHEMICALS AND REAGENTS

Acetonitrile and tetrahydrofuran were HPLC-grade and monobasic potassium phosphate was analytical grade. Solid-phase extraction (SPE) columns -Strata-X-C 30 mg/1 ml with SCX/RP sorbent were purchased from Phenomenex. Clopidogrel-carboxylic acid and ticlopidine hydrochloride used as an internal standard were reference standard substances.

SAMPLE PREPARATION

Human plasma was obtained from volunteers who had received clopidogrel therapy. 0.2 N HCl and 50 µL internal standard solution were added to 0.5 ml plasma and, then samples were mixed for 10s. Solid-phase extraction was performed in several steps. The SPE column was washed with 1 ml 0.1 N HCl and then with 1 ml methanol. The elution of the compounds of interest was performed with 1 ml 5% ammonia solution prepared in methanol and acetonitrile mixture 1:1. The eluent was collected in clean glass tubes and dried under nitrogen. The residue was reconstituted in 200 µL freshly prepared mobile phase. 50 µL from this solution were injected into the HPLC system.

CHROMATOGRAPHY

The chromatographic separation was performed on Gemini C18, 150x4.6 mm, 5µm, Phenomenex analytical column and suitable Gemini C18, 4.0x3.0 mm Phenomenex guard column at 25°C. The mobile phase consisted of buffer solution of 0,01M monobasic potassium phosphate pH=3.2, acetonitrile and tetrahydrofuran in the ratio 80:18:2 was used. The final pH of mobile phase was 3.5. The mobile phase flow was 1 ml/min and the analysis was monitored under the wavelength of 202 nm. The injection volume was 50µL.

RESULTS AND DISCUSSION

A rapid, simple and sensitive HPLC method for determination of CCA in human plasma was developed and validated according to FDA Guideline (5).

The selectivity of the analytical method was determined by comparing the chromatograms of the diluents, CCA and internal standards, blank plasma and spiked plasma samples. There were no interfering peaks at the retention times of CCA and IS. The retention times of CCA and IS were 6,1 and 7,6 minutes, respectively (Fig.1).

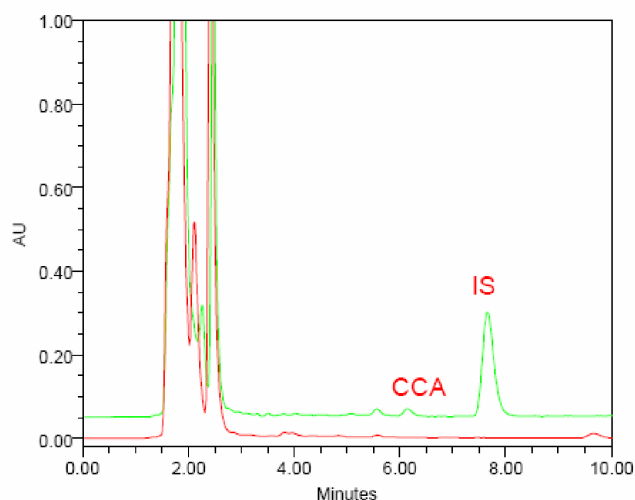


Fig.1. Chromatograms of standard solution of CCA (0.2 µg/ml CCA) and pure plasma

Linearity was performed at 10 concentration points (excluding blank values) in the concentration range from 0.2 µg/ml to 10 µg/ml in triplicate, on three different days. The method has shown linear ($R^2=0.9996$). Accuracy was determined by 5 times replicate analysis of plasma samples at three different concentration levels of CCA, 0.4, 1 и 8 µg/ml. Table 1 shows the intra-day accuracy and precision.

Table 1: Intra-day accuracy and precision

	0.4µg/ml	1µg/ml	8µg/ml
	CCA	CCA	CCA
Average (n=5)	0.4102	1.086	8.1526
SD	0.0145	0.0198	0.0409
RSD (%)	8.6470	1.6851	0.0615

Table 2: Intermediate accuracy and precision

CCA	Added (µg/ml)	Added (µg/ml)	Added (µg/ml)
	0.4	1	8
	Found (µg/ml)	Found µg/ml	Found µg/ml
Average (n=15)	0.413	1.143	8.307
SD	0.020	0.024	0.185
RSD (%)	4.928	2.067	2.230

Robustness was investigated using Plackett-Burman experimental design (N=8). Results of robustness testing by means of effect of investigated factors on resolution (Rs) between peaks of CCA and IS are shown in Table 3. The method has shown robust.

Table 3: Robustness testing

Investigated factors	Resolution (Rs)	
	Effect	P-value
pH of mobile phase	2.507	0.0933
Temperature of the column	-1.94	0.1576
Buffer content in the mobile phase (v/v)	1.149	0.1188
ACN content in the mobile phase (v/v)	-2.421	0.0945
THF content in the mobile phase (v/v)	1.87	0.1355
Flow rate (ml/min)	2.255	0.1033

CONCLUSION

The HPLC analytical method for determination of clopidogrel-carboxylic acid in spiked human samples has shown parameters of precision, accuracy, linearity, limits of quantification and detection and robustness in the limits of validation criteria. The results of this validation shown that CCA can be analyzed in human plasma in the concentration range 0.2µg/ml to 10µg/ml and the proposed HPLC method can be successfully used for testing relative bioavailability of pharmaceutical products containing clopidogrel.

REFERENCES:

1. Lins R, Broekhysen J, Necciani J, Deroubax X: Pharmacokinetic profile of 14C-labelled clopidogrel. *Semin. Thromb. Hemost.* 1999; 25 suppl 2: 29-33.
2. Petersen KU: Relevance of metabolic activation pathways: the example of clopidogrel and prasarel. *Arzneimittel forschung* 2009; 59(5): 213-27.
3. Roden DM and Stein CM: Clopidogrel and the concept of high-risk pharmacokinetics. *Circulation* 119: 2127-2130, 2009.
4. Souri E and Dalvandi A.: Validated HPLC method for determination of carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Biomed.Chromatograph.* 20: 1309-1314, 2006
5. FDA. Guidance for Industry; Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and human services, Food and Drug administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), May 2001(GENERIC).

РАЗВОЈ НА HPLC МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КЛОПИДОГРЕЛ-КАРБОКСИЛНА КИСЕЛИНА КАКО НЕАКТИВЕН МЕТАБОЛИТ НА КЛОПИДОГРЕЛ ВО ХУМАНА ПЛАЗМА

Л. Богдановска, Н. Наков,
Ј.Ацевска, С.Трајковиќ-Јолевска,
А. Димитровска, Р. Петковска

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“,
Фармацевтски факултет, Водњанска 17, 1000, Скопје, Македонија

ВОВЕД

Клопидогрел е пролек кој по перорална администрација подлежи на екстензивен метаболизам во црниот дроб до неговиот активен метаболит (1). Присуството на лекот или неговиот активен метаболит во плазмата не може да се одреди со задоволителна точност. Поради тоа, фармакокинетскиот профил на клопидогрел се проценува преку определување на серумската концентрација на главната циркулирачка компонента, клопидогрел-карбоксилна киселина која претставува фармаколошки неактивен дериват на клопидогрелот (2,3). Одредувањето на неактивниот метаболит на клопидогрел може да се изведе со неколку GC-MS, LC-MS или HPLC методи (4). Целта на нашето истражување беше да оптимизација и валидација на HPLC метод со UV детекција за определување на клопидогрел-карбоксилна киселина (CCA) во хумана плазма.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

РЕАГЕНСИ

ACN и THF (HPLC-grade); KH_2PO_4 p.a.; колона за цврсто-фазна екстракција Strata-X-C- 30mg/1ml од Phenomenex; CCA и тиклопидин хидрохлорид (IS) референтни стандардни супстанции.

ПОДГОТОВКА НА ПРИМЕРОКОТ

На 0.5 ml плазма од пациенти кои го ординирале лекот се додаваат 0.5 ml 0.2 N HCl и 50µL раствор на внатрешен стандард. Примероците се мешаат во 10 s и се подложуваат на цврсто фазна екстракција (SPE). SPE колоната се кондиционира со 1 ml 0.1 N HCl по што следи нејзино активирање со 1 ml метанол. Елуирањето на компонентите се изведува со 1 ml 5% амонијак претходно растворен во смеса од метанол и ацетонитрил во однос 1:1. Елуентот се собира во чисти стаклени цевчиња и се суши во атмосфера на азот. Сувиот остаток се реконституира во 200 µL све-

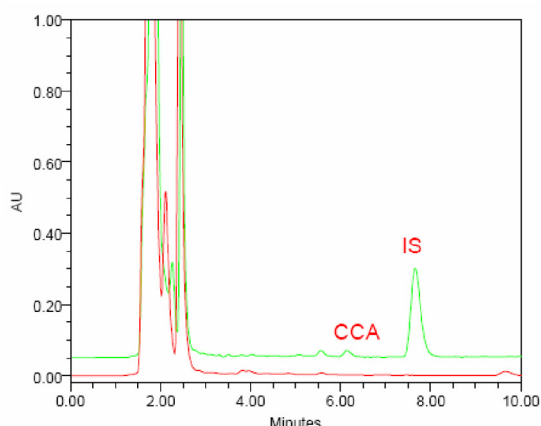
жо подготвена мобилна фаза. 50µL од реконституираниот раствор се инјектираат во HPLC системот.

ХРОМАТОГРАФСКАТА АНАЛИЗА

За хроматографско разделување користена е Gemini C18, 150x4.6 mm, 5µm, Phenomenex аналитичка колона и соодветна Gemini C18, 4.0x3.0 mm Phenomenex предколона и мобилната фаза составена од 0.01M калиум дихидроген фосфат со pH=3.2, ацетонитрил и тетраhydroфуран во однос 80/18/2, Конечната pH вредност на мобилната фаза е 3.5. Протоколот на мобилната фаза е 1 ml/min а UV-детекција на бранова должина од 202 nm. Волуменот на инјектирање изнесува 50µL.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Развиен е брз, осетлив и прецизен HPLC метод за определување на CCA во хумана плазма, валидиран според препораките на FDA водичот (5). На хроматограмите на растворувачот, раствор на стандардна супстанца, чиста плазма и плазма со додаден лек, користени за определување на селективноста на методот, не се забележани интерферирачки пикови на ретенционото време на CCA и IS. Ретенционите времиња на CCA и IS беа 6.1 и 7.6 минути, соодветно (сл.1).



Сл.1. Хроматограми на раствор на стандардната супстанција CCA (0.2 µg/ml CCA) и чиста плазма

Линеарноста беше определена во концентрациско подрачје од 0.2 до 10µg/ml во 10 концентрациски точки (тројни примероци) на CCA во три различни денови ($R^2 = 0,9996$). Точноста беше одредена на примероци од плазма во која беше додадена клопидогрел - карбоксилна киселина, во три различни концентрации: 0.4, 1 и 8µg/ml (Табела 1)

	0.4µg/ml	1µg/ml	8µg/ml
	CCA	CCA	CCA
Ср.вред. (n=5)	0.4102	1.086	8.1526
SD	0.0145	0.0198	0.0409
RSD (%)	8.6470	1.6851	0.0615

Табела 1: Точност во еден работен ден

Интермедиерната прецизност беше одредена преку анализа на 5 индивидуално приготвени примероци на плазма кои содржат додаден лек во три различни концентрации (Табела 2).

ССА	Додадено (µg/ml)	Додадено (µg/ml)	Додадено (µg/ml)
	0.4	1	8
	Најдено (µg/ml)	Најдено (µg/ml)	Најдено (µg/ml)
Ср.вредност (n=15)	0.413	1.143	8.307
SD	0.020	0.024	0.185
RSD (%)	4.928	2.067	2.230

Табела 2: Интермедиерна прецизност

Аналитичкиот принос за CCA во примероци од плазма со лек спореден со водени раствори на CCA изнесува 95.87%. Робустноста на методот беше определена со примена на Plackett-Burman experimental design (N=8). Резултатите од испитувањето на робустноста, изразени како ефект на испитуваните хроматографски услови на резолуцијата меѓу пиковите на IS и CCA е прикажана во Табела 3.

Испитувани фактори	Резолуција (Rs)	
	Ефект	P-вредн.
pH на мобилна фаза	2.507	0.0933
Температура на колонага	-1.94	0.1576
Содржина на пуфер во мобилна фаза (v/v)	1.149	0.1188
Содржина на ACN во мобилна фаза (v/v)	-2.421	0.0945
Содржина на THF во мобилна фаза (v/v)	1.87	0.1355
Проток (ml/min)	2.255	0.1033

Табела 3: Робустност на методот

Оптимизирианиот метод е робуствен во испитуваното експериментално подрачје на хроматографските фактори.

ЗАКЛУЧОК

Врз основа на поставените цели развиен е и оптимизиран HPLC метод за квантитативно одредување на CCA во хумана плазма. Методот ги исполнува сите критериуми пропишани во FDA водичот за валидација на биоаналитички методи. Резултатите добиени при валидацијата на покажуваат дека методот може да биде применет за определување на релативната биорасположивост на фармацевтски производи кои содржат клопидогрел.

ЛИТЕРАТУРА:

- Lins R, Broekhysen J, Necciani J, Deroubax X: Pharmacokinetic profile of 14C-labelled clopidogrel. Semin. Thromb. Hemost. 1999; 25 suppl 2: 29-33.
- Petersen KU: Relevance of metabolic activation pathways: the example of clopidogrel and prasugrel. Arzneimittel forschung 2009; 59(5): 213-27.
- Roden DM and Stein CM: Clopidogrel and the concept of high-risk pharmacokinetics. Circulation 119: 2127-2130, 2009.
- Souri E and Dalvandi A.: Validated HPLC method for determination of carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. Biomed.Chromatogrph. 20: 1309-1314, 2006
- FDA. Guidance for Industry; Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and human services, Food and Drug administration, Center for Drug Evaluation and Research(CDER), Center for Veterinary Medicine(CVM), May 2001(GENERIC).

OPTIMIZATION OF METHOD FOR DETERMINATION OF ACE INHIBITORS IN HUMAN PLASMA BASED ON ENZYME-INHIBITOR BINDING ASSAY FOLLOWED BY RP-HPLC

L. Bogdanovska, N. Nakov, V. Karcev, A. Dimitrovska, R. Petkovska

University "Ss Cyril and Methodius", Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

INTRODUCTION

ACE inhibitors are drugs that inhibit the activity of angiotensin-converting enzyme, thereby reducing hypertension. Determination of ACE-inhibitors, such as lisinopril and fosinopril in biological samples, can be performed by fluorimetric, LC-MS and GC-MS methods with or without derivatisation (1,2,3). These methods for direct determination of ACE inhibitors in human plasma are fast and precise, but lack of reliability. ACE inhibitors in human plasma can also be quantified using indirect enzyme-inhibitory binding reaction (4). In our study, we used enzymatic reaction for degradation of ACE inhibitors in human plasma and develop, optimize and validate RP-HPLC method for determination of hippuric acid (HA) as a product of enzyme-inhibitory reaction.

MATERIALS AND METHODS

CHEMICALS AND REAGENTS

Hipiril-L-Histidil-L-Leucin (as a free base), hippuric acid (as a free acid) and potassium salt of phtalic acid were obtained from Sigma Chemical Co. The substrate, Hipuril-L-Histidil-L-Leucin, was prepared in buffer (100 mM potassium phosphate and 300 mM sodium chloride, pH=8.3). The internal standard solution of phtalic acid was prepared in HPLC-grade methanol.

INHIBITOR-BINDING ASSAY

The amount of lisinopril and fosinoprilat bound to the enzyme is inversely related to the amount of hippuric acid (HA) liberated on hydrolysis from the artificial substrate Hipuril-L-Histidil-L-Leucin (4). Hippuric acid was determined by RP-HPLC method using phtalic acid as an internal standard.

CHROMATOGRAPHY

The chromatographic separation was performed on Polar-RP 80A Synergi, 150x4.6 mm, 4µm, Phenomenex analytical column and suitable Polar-RP Synergi, 4.0x3.0mm, 4µm Phenomenex guard column at 25°C. The mobile phase was ammonium acetate buffer (0.02M, pH=4.3) and methanol in ratio 95:5 with flow rate of 1.4 ml/min. UV detection was performed at 228 nm. The injection volume was 50µL.

RESULTS AND DISCUSSION

The validation of HPLC bioanalytical method for determination of HA in human plasma was performed according to FDA Guidance (5). The selectivity of the method was confirmed by comparing the chromatograms of the diluents, HA and internal standards, blank plasma and spiked plasma samples. There were no interfering peaks at the retention times of HA and IS.

The retention times of IS and HA were 4.1 and 5.6 minutes, respectively (Fig.1).

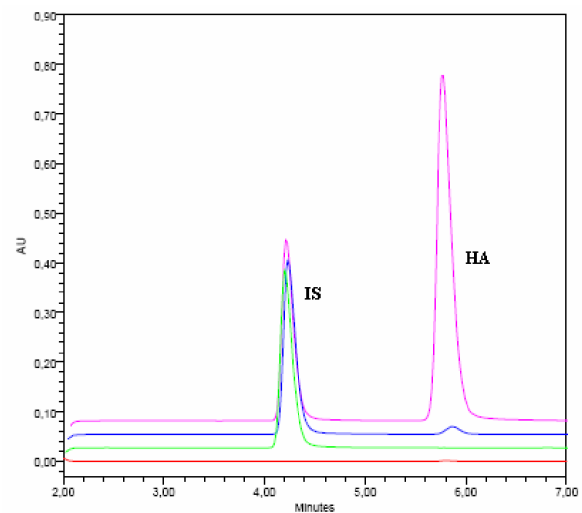


Fig.1. Chromatograms of pure plasma, plasma spiked with IS and plasma containing 0,15µg/0.1 ml HA

Linearity was performed at 10 concentration points in the concentration range from 0.25 µg/ml to 25 µg/ml in triplicate, on three different days. The method has shown linear, ($R^2=0.9996$). Accuracy was determined by 5 times replicate analysis of plasma samples at three different concentration levels of HA (Table 1)

Table 1: Intra-day precision

HA	Added (µg/0.1ml)	Added (µg/0.1ml)	Added (µg/0.1ml)
	0.5	5.0	20
Sample	Determined (µg/0.1ml)	Determined (µg/0.1ml)	Determined (µg/0.1ml)
Average (n=6)	0.495	4.991	20.026
SD	0.002	0.009	0.063
RSD (%)	0.397	0.185	0.316

Intermediate precision was determined by measuring 5 individually prepared spiked plasma samples at 3 different concentration levels of HA: low, middle and high in three different days. The content of HA (µg/ml plasma) was calculated for each sample against the standard calibration curve. From 15 determinations the average value and relative error were calculated. Results are shown in Table 2.

Table 2: Intermediate precision

HA	0.5 µg/0.1ml	5.0 µg/0.1ml	20 µg/0.1ml
Average (n=18)	0.525	5.319	20.759
SD	0.034	0.243	1.139
RSD (%)	6.48	4.56	5.48

The recovery for HA in spiked plasma samples, compared to HA water samples, is 97.94-101.01%. Robustness was investigated using Plackett-Burman experimental design (N=12). Results of robustness testing by means of effect of investigated factors on resolution (Rs) between peaks of HA and IS are shown in Table 3.

Table 3: Robustness testing

Investigated factors	Resolution (Rs)	
	Effect	P-value
pH of mobile phase	-1,9565	1,20E-06
Flow rate (ml/min)	-0,1322	0,1229
Temperature of the column	-0,3608	0,0039
MOH content in the mobile phase (v/v)	-0,4672	0,0012
Ammonium acetate buffer concentration (M)	0,3428	0,0048

The method has shown robust.

The proposed validated method was successfully applied in determination of lisinopril in human plasma taken from healthy volunteers after oral administration of single dose of 20 mg lisinopril. Table 4 shows plasma concentrations (ng/ml) of lisinopril obtained from ten healthy volunteers.

Table 4: Plasma concentrations of lisinopril (ng/ml) in healthy volunteers after administration of single dose of 20mg

N°/h	1	8	24	48
1	1.0	316.9	13.7	2.7
2	3.1	198.5	20.4	0.7
3	0.7	88.2	14.7	0.7
4	2.1	149.2	26.5	2.1
5	5.8	196.3	26.9	3.5
6	4.1	212.4	20.0	1.9
7	0.7	144.7	25.4	4.4
8	1.9	187.5	27.4	2.1
9	1.1	24.2	18.4	3.1
10	1.2	172.6	24.1	3.7

CONCLUSION

The data presented in this study indicate that the proposed HPLC method for determination of HA in plasma samples is repeatable, reproducible, linear in demanding range, accurate and robust. The results from the validation study shown that HA can be analyzed in human plasma in the concentration range of 0.25µg/ml to 25µg/ml with sufficient reliability for pharmacokinetic studies. This method can further be used for determination and quantification of many ACE-inhibitors in human plasma.

REFERENCES:

- Sagrilli O, Ersoy L: An HPLC method for the determination of lisinopril in human plasma and urine with fluorescence detection. J. Chrom. B 2004, 809: 159-165.
- Huang J, Gao S, Guo Q. Development of a LC-MS assay for the quantification of lisinopril in human plasma. Rapid. Commun. Mass. Spectr., 2006, 20: 248-252.
- Greenbaum et al. Comparison of the pharmacokinetics of fosinoprolat with enalaprilat and lisinopril in patients with congestive heart failure and chronic renal insufficiency. Brit. J Clin. Pharm. 2000; 49(1): 23-31.
- Anzenbacherova E, Anzenbacher P, Macek K, and Kvetina J. Determination of enzyme (angiotensin convertase) inhibitors based on enzymatic reaction followed by HPLC. J. Pharm. Biomed. Anal. 24: 1151-1156, 2001.
- FDA. Guidance for Industry; Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and human services, Food and Drug administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), May 2001(GENERIC).

ОПТИМИЗАЦИЈА НА RP-HPLC МЕТОД ЗА ОДРЕДУВАЊЕ НА АКЕ ИНХИБИТОРИ ВО ХУМАНА ПЛАЗМА СО ПРИМЕНА НА РЕАКЦИЈА НА ЕНЗИМСКА ДЕГРАДАЦИЈА

Л.Богдановска, Н.Наков, В. Карчев, А. Димитровска, Р. Петковска

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Фармацевтски факултет, Водњанска 17, 1000, Скопје, Македонија

ВОВЕД

АКЕ инхибиторите спаѓаат во најуспешните лекови кои се користат во борбата против хипертензија. Концентрацијата на АКЕ инхибиторите, како што се лизиноприл и фосиноприл, во биолошки примероци, може да се одреди со флуориметриски, GC-MS и LC-MS методи со или без постапки на дериватизација (1,2,3). Овие методи за директно одредување на АКЕ инхибиторите во плазма се брзи и прецизни, но покажуваат недостатоци во поглед на достапноста. АКЕ инхибиторите во хумана плазма можат да се одредат и со примена на ензимско-инхибиторни методи (4).Целта на овој труд е развој и оптимизација и валидација на HPLC метод за определување на хипурна киселина (НА) која претставува продуктот на ензимско-инхибиторната реакција на АКЕ инхибиторот (лизиноприл и фосиноприл).

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

РЕАГЕНСИ

Hipuril - L - Histidil - L - Leucin, субстрат (слободна база), хипурна киселина и калиумовата сол на фтална киселина се добиени од Sigma Chemical Co. Субстратот се подготвува во пуфер (100 mM калиум фосфат и 300 mM натриум хлорид, pH=8.3). Растворот на внатрешниот стандард (IS), фтална киселина, е подготвен во метанол со HPLC чистота.

ЕНЗИМСКО-ИНХИБИТОРЕН МЕТОД

Концентрацијата на АКЕ инхибиторот кој стапил во реакција со ензимот е обратно пропорционална со концентрацијата на хипурна киселина која се ослободува од субстратот. Количината на создадена хипурна киселина ја прикажува преостанатата активност на АКЕ инхибиторот.

ХРОМАТОГРАФСКА СЕПАРАЦИЈА

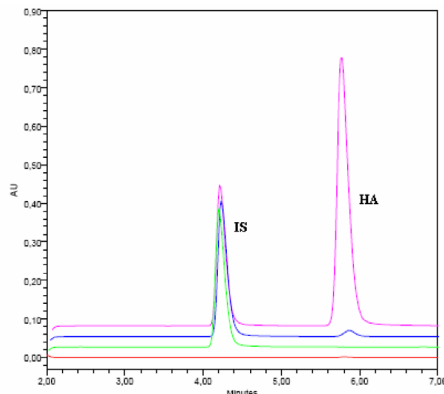
За хроматографско разделување користена е Polar-RP 80A Synergi, 150x4.6 mm, 4µm, Phenomenex хроматографска колона и соодветна Polar-RP Synergi, 4.0x3.0 mm, 4µm Phenomenex предколона на температура од 25°C и мобилната фаза составена од 0.02M амониум ацетат со pH=4.3 и метанол во однос 95/5. Протоколот на мобилната фаза е 1.4 ml/min, а UV- детекцијата е на бранова должина од 228 nm. Волуменот на инјектирање е 20µl.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Валидацијата на HPLC биоаналитичкиот метод за определување на НА во хумана плазма е извршена во согласност со барањата на FDA водичот (5).

Селективноста на методот беше определена со споредба на хроматограмите на растворувачот, раствор на НА и IS, чиста плазма

и плазма со додаден лек, при што не се забележани интерфе-рирачки пикови на ретенционото време на НА и IS. Ретенционите времиња на IS и НА беа 4.1 и 5.6 минути, соодветно (сл.1).



Сл.1.Хроматограми чиста плазма, плазма со интерен стандард и плазма со 0,15µg/0.1 ml НА

Линеарноста беше определена во концентрациско подрачје од 0.25 до 25 µg/ml во 10 концентрациски точки на НА, во три различни денови (R²= 0.9996). Точноста беше одредена на примероци од плазма во која беше додадена НА, во три различни концентрации (Табела 1).

Табела 1: Точност во еден работен ден

НА	Додадено (µg/0.1ml)	Додадено (µg/0.1ml)	Додадено (µg/0.1ml)
	0.5	5.0	20
Примерок	Најдено (µg/0.1ml)	Најдено (µg/0.1ml)	Најдено (µg/0.1ml)
Ср.вред. (n=6)	0.495	4.991	20,026
SD	0.002	0.009	0.063
RSD (%)	0.397	0.185	0.316
Точност (%)	99.0	99.82	100.13

Интермедиерната прецизност беше одредена преку анализа на 5 индивидуално приготвени примероци на плазма кои содржат додаден лек во три различни концентрации (Табела 2).

Табела 2: Интермедиерна прецизност

НА	0.5 µg/0.1ml	5.0 µg/0.1ml	20 µg/0.1ml
Ср.вредност (n=18)	0.525	5.319	20.759
SD	0.034	0.243	1.139
RSD (%)	6.48	4.56	5.48

Аналитичкиот принос за НА во примероци од плазма со лек спореден со водени раствори на НА, изнесува од 97.94-101.01%. Робустноста на методот беше определена со примена на Plackett-Burmanе experimental design (N=12). Резултатите од испитувањето на робустноста, изразени како ефект на испитуваните хроматографски услови на резолуцијата меѓу пиковите на IS и НА е прикажана во Табела 3.

Табела 3: Робустност на методот

Испитувани фактори	Резолуција (Rs)	
	Ефект	Р-вредн.
рН на мобилна фаза	-1,9565	1,20E-06
Проток (ml/min)	-0,1322	0,1229
Температура на колоната	-0,3608	0,0039
Содржина на МОН во мобилна фаза (v/v)	-0,4672	0,0012
Концентрација на амониум ацетатен пуфер (M)	0,3428	0,0048

Испитувани фактори Резолуција (Rs) Ефект Р-вредн. рН на мобилна фаза -1,9565 1,20E-06 Проток (ml/min) -0,1322 0,1229 Температура на колоната -0,3608 0,0039 Содржина на МОН во мобилна фаза (v/v) -0,4672 0,0012 Концентрација на амониум ацетатен пуфер (M) 0,3428 0,0048 Предложениот метод беше успешно применет за определување на лизиноприл во хумана плазма земена од здрави доброволци по апликација на единечна доза од 20 mg лизиноприл (Табела 4).

Табела 4: Плазматски концентрации на лизиноприл (ng/ml) кај здрави доброволци по перорална администрација на единечна доза од 20mg

N°/h	1	8	24	48
1	1.0	316.9	13.7	2.7
2	3.1	198.5	20.4	0.7
3	0.7	88.2	14.7	0.7
4	2.1	149.2	26.5	2.1
5	5.8	196.3	26.9	3.5
6	4.1	212.4	20.0	1.9
7	0.7	144.7	25.4	4.4
8	1.9	187.5	27.4	2.1
9	1.1	24.2	18.4	3.1
10	1.2	172.6	24.1	3.7

ЗАКЛУЧОК

Резултатите од валидацијата на предложениот HPLC метод за определување на НА во плазма покажуваат дека методот линеарен, прецизен, точен и робустен. Методот може да се примени за определување на хипурна киселина во плазма во концентрациско подрачје од 0.25 µg/ml до 25 µg/ml. Тој дава можност за успешна примена во фармакокинетски студии, како метод за определување на концентрацијата на АКЕ инхибиторните лекови во хуманата плазма.

ЛИТЕРАТУРА:

- Sagrilli O, Ersoy L: An HPLC method for the determination of lisinopril in human plasma and urine with fluorescence detection. J. Chrom. B 2004, 809: 159-165.
- Huang J, Gao S, Guo Q. Development of a LC-MS assay for the quantification of lisinopril in human plasma. Rapid. Commun. Mass. Spectr., 2006, 20: 248-252.
- Greenbaum et al. Comparison of the pharmacokinetics of fosinoprolat with enalaprilat and lisinopril in patients with congestive heart failure and chronic renal insufficiency. Brit. J Clin. Pharm. 2000;49(1): 23-31.
- Anzenbacherova E, Anzenbacher P, Macek K, and Kvetina J. Determination of enzyme (angiotensin convertase) inhibitors based on enzymatic reaction followed by HPLC. J. Pharm. Biomed. Anal. 24: 1151-1156, 2001.
- FDA. Guidance for Industry; Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and human services, Food and Drug administration, Center for Drug Evaluation and Research(CDER), Center for Veterinary Medicine(CVM), May 2001(GENERIC).

COMPARISON OF THE HYDRODYNAMIC EFFECTS ON THE DISSOLUTION RATE IN THE PADDLE APPARATUS AND ITS DESIGN MODIFICATIONS

Blagica Debarlieva, Irena Brasnarska, Ema Kikovska-Stojanovska, Biljana Sapkareva, Sonja Ugarkovic

Research and Development, ALKALOID AD, Aleksandar Makedonski 12, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

INTRODUCTION

Drug dissolution testing is an integral part of drug product development and quality assessment. Often drug dissolution testing is a regulatory requirement to establish the quality of a drug product^[1]. It utilizes specialized equipment, commonly known as basket and paddle apparatuses, also referred to as Apparatus 1 and 2, respectively. It has been well documented that results obtained from dissolution testing using these apparatuses may be highly variable and unpredictable^[2] and often lack relevance to the *in vivo* drug release characteristics (bioavailability) of the products^[3]. In some reported studies^[4], it has also been demonstrated that, because of the lack of an adequate stirring and mixing environment in the dissolution vessels, inaccurate comparative drug dissolution/release of the test products may also be observed.

Regulatory agencies often consider dissolution methods with Apparatus 2 developed using speed of 50 rpm to represent the most appropriate operating conditions since it is assumed that it provides optimum discriminating power with respect to both manufacturing process and stability changes. However, for certain tablet formulations, the dissolution rates can be a reflection of system artifacts rather than a discriminatory tool. Under these conditions there is variability in dissolution rates due to radial flow in the cylindrical vessel. A "dead zone" forms at the bottom of the vessel where the agitation rate is minimal. The disintegrated mass of the dosage form settles in this zone forming a cone of trapped drug particles leading to low dissolution rates.

To address these flaws and artifacts of the currently used apparatuses, we have demonstrated the role of hydrodynamics in the dissolution testing with the Apparatus 2 by comparing the dissolution rates achieved with normal set-up and some design modifications.

MATERIALS AND METHODS

We performed dissolution tests of immediate release tablets containing BCS Class II active substance using paddle apparatus (Apparatus 2) at 50 rpm under normal set-up, by tilting the vessels by 7 mm, in the Peak™ vessels and by using crescent-shaped spindles (Figure 1). The tilting was achieved by inserting shims between the lips of each vessel and the base plate of the dissolution equipment resulting in tilt of 7 mm. The modified spindles were shaped from commercially available brush made of stiff twisted metal wires and fine bristles, attached to the shaft as a substitute for the paddle spindle. The bristles were in contact with the surface of the vessel. The medium was 900 ml simulated gastric juice without pepsin and the bath temperature was maintained at 37±0.5°C. Samples were pulled at 20 minutes, centrifuged and analyzed using a UV-visible spectrophotometer at a wavelength of 291 nm.



Figure 1. Photographic image of Peak™ vessel (left) and crescent-shaped spindle (right).

RESULTS AND DISCUSSION

The active substance is a low solubility drug and some of the excipients in the formulation increase the viscosity in the microenvironment of the disintegrated particle making it a good candidate for our research.

As observed in Table 1 under the normal set-up 52.73±1.14% of the active substance was released.

TABLE 1.

	Normal set-up	Tilted 7mm	Peak™ vessel	Crescent-shaped spindles
1	53.27	58.40	60.75	61.34
2	51.29	56.53	62.36	62.05
3	54.23	57.94	61.31	59.99
4	53.17	56.37	60.29	62.76
5	51.44	54.94	60.04	61.54
6	52.95	59.85	61.46	62.59
AVERAGE	52.73	57.34	61.04	61.71
STDEV	1.14	1.74	0.85	1.01
RSD	2.17	3.03	1.40	1.64
MIN	51.29	54.94	60.04	59.99
MAX	54.23	59.85	62.36	62.76
Q1	51.82	56.41	60.41	61.39
Q2	53.06	57.24	61.03	61.80
Q3	53.25	58.29	61.42	62.46
Q3-Q1	1.43	1.88	1.02	1.07

Table 1. Results from the effect of different apparatus settings on the dissolution performance of studied samples (Q stands for 'quartile') When the vessels were tilted, the release rate increased to 57.34±1.74%. The flow at the bottom of the vessel increases when the vessels are tilted. This in turn disrupts the cone and exposes more drug to the dissolution medium, enabling the drug to go into solution (Figure 3).

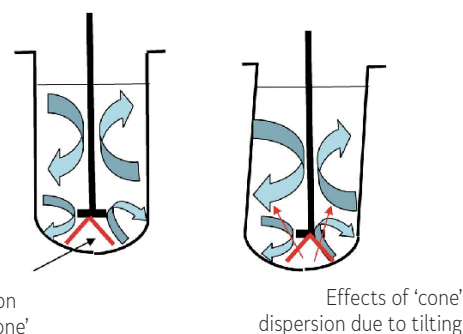


Figure 3. Schematic depiction of the dissolution in the normal set-up and with the tilted vessels adopted from T. Mirza et al, 2005^[5].

The release rate from Peak™ vessels was 61.04±0.85%. The cone in the Peak vessels is not stationary and is located on the top of the convex shaped bottom. This explains the higher release rates and lower variability of the results. With the crescent shaped spindle the release rate

was $61.71 \pm 1.01\%$. The bristles of the crescent shaped spindle were continuously sweeping the bottom and sides of the vessel which accomplished even distribution and mixing of the disintegrated material avoiding any accumulation, therefore resulting with higher dissolution rates. In the tests performed with the design modifications, the contact area between the particles of disintegrated tablets and the dissolution medium is increased and the thickness of the boundary layer is decreased, which improves the dissolution rate.

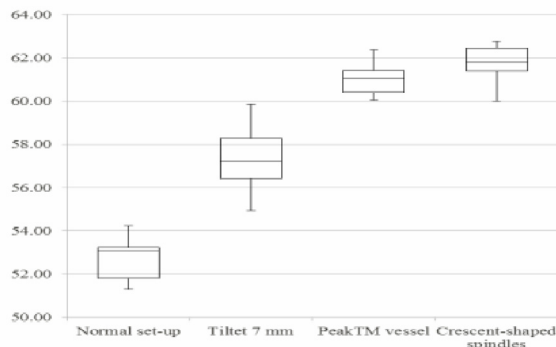


Figure 2. Box and whiskers plot of the released active substance under the normal set-up and the design modifications.

CONCLUSION

Using 50 rpm with Apparatus 2 for the studied tablet formulation did not provide adequate mixing resulting in pockets of unstirred area and variable hydrodynamics, thus giving rise to dissolution results that are occasionally highly variable and unpredictable. The coning artifact effect can be easily minimized or eliminated by simply increasing the paddle rotation speed, though some times at cost of the discriminating ability of the dissolution method.

REFERENCES

- Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 1997, <http://www.fda.gov/cder/guidance/1713bp1.pdf>.
- McCarthy, L. G.; Kosiol, C.; Healy, A. M.; Bradley, G.; Sexton, J. C.; Corngan, O. I. Simulating the Hydrodynamic Conditions in the United States Pharmacopeia Paddle Dissolution Apparatus. *AAPS PharmSciTech* 2003, 4, 172-187.
- Meyer, M. C.; Straughn, A. B.; Mhatre, R. M.; Shah, V. P.; Williams, R. L.; Lesko, L. J. Lack of In Vivo/In Vitro Correlations for 50 mg and 250 mg Primidone Tablets. *Pharm. Res.* 1998, 15, 1085-1089.
- Qureshi, S. A. Improved Drug Dissolution and Product Characterization Using the Crescent-shaped Spindle. *J. Pharm. Pharmacol.* 2004, 56, 1135-1141.
- T. Mirza et al., Evaluation of Dissolution Hydrodynamics in the USP, Peak and Flat-Bottom Vessels using Different Solubility Drugs, 2005, *Dissolution Technol.* 12, 11-16.

ВЛИЈАНИЕ НА ХИДРОДИНАМИКАТА ВО ТЕСТОВИТЕ НА ДИСОЛУЦИЈА СО АПАРАТ ВЕСЛО И НЕГОВИ МОДИФИКАЦИИ

Благица Дебарлиева, Ирена Брашнарска, Ема Киковска-Стојановска, Билјана Шапкарева, Соња Угарковиќ

Истражување и развој, АЛКАЛОИД АД, Александар Македонски 12, 1000 Скопје, Република Македонија

ВОВЕД

Тестот на дисолуција претставува интегрален дел од развојот на нови производи и континуирана процена на нивниот квалитет^[1]. Најчесто применувани апарати за тестот на дисолуција се Апарат 1 (корпа) и Апарат 2 (весло). Неретко се случува резултатите добиени со овие апаратури да се варијабилни и непредвидливи^[2], и да не корелираат со биорасположивоста на производот^[3]. Постојат студии^[4] каде е демонстрирано дека поради недостаток на соодветно мешање во дисолуциските чаши, се добиваат погрешни податоци за профилите на ослободување на активната супстанца.

Тестовите на дисолуција изведени со метод на весло со 50 грм се сметаат како најсоодветни од страна на регулаторните агенции, заради претпоставката дека обезбедуваат оптимална дискриминација во однос на производствениот процес и стабилноста на препаратите. Во одредени случаи, резултатите од тестот на дисолуција изведен под овие услови не се совпаѓаат со реалните карактеристики на формулацијата, туку се последица на хидродинамиката. Радијалниот тек на медиумот во чашата условува формирање на "мртва зона" на дното, каде мешањето е минимално. Во оваа зона се формира купа од дезинтегрирана дозжна форма во која се заробени честичките на активната супстанца, што понекогаш доведува до пониски и варијабилни резултати.

Целта на трудот е да се демонстрира влијанието на хидродинамиката во тестовите на дисолуција преку споредба на резултатите добиени од Апарат весло со негови модификации.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Направени се тестови на дисолуција на конвенционални таблети кои содржат BCS Class II компонента со примена на апарат весло. Модификациите се направени со закосување на чашите за 7 mm, со примена на Peak™ чаши и со замена на веслото со полукружна четка како мешалка (Слика 1). Закосувањето е направено со вметнување на поликарбонатни парчиња помеѓу држачите на чашите и горната плоча од апаратот. Модифицираната мешалка претставува комерцијална четка за епрувети, обликувана во форма на полумесечина и прикачена за осовината наместо веслото. Влакната од четката се во постојан контакт со површината од чашата. Сите тестови се изведуваат во 900 mL вештачки желудочен сок без пепсин, а температурата на бањата се одржува на $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Примероците се земаат на 20 минути, се центрифугираат и се мерат на UV-Vis спектрофотометар на бранова должина од 291 nm.



Слика 1. Фотографија од Peak™ чаша (лево) и од полукружна четка - мешалка (десно).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

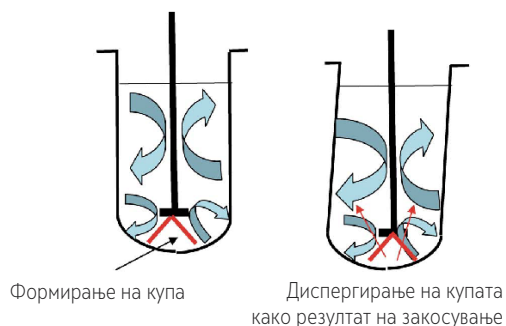
Испитуваната активна супстанца е со ниска растворливост и дел од ексципиентите во формулацијата ја зголемуваат вискозноста на микросредината во која се случува ослободувањето, што го оправдува изборот на овој вид формулација за соодветните испитувања.

Од податоците во Табела 1 се забележува дека при стандардни услови ослободени се $52.73 \pm 1.14\%$ активна супстанца.

	Весло 50 rpm	Закоосување 7 mm	Peak™ чаша	Четка
1	53.27	58.40	60.75	61.34
2	51.29	56.53	62.36	62.05
3	54.23	57.94	61.31	59.99
4	53.17	56.37	60.29	62.76
5	51.44	54.94	60.04	61.54
6	52.95	59.85	61.46	62.59
AVERAGE	52.73	57.34	61.04	61.71
STDEV	1.14	1.74	0.85	1.01
RSD	2.17	3.03	1.40	1.64
MIN	51.29	54.94	60.04	59.99
MAX	54.23	59.85	62.36	62.76
Q1	51.82	56.41	60.41	61.39
Q2	53.06	57.24	61.03	61.80
Q3	53.25	58.29	61.42	62.46
Q3-Q1	1.43	1.88	1.02	1.07

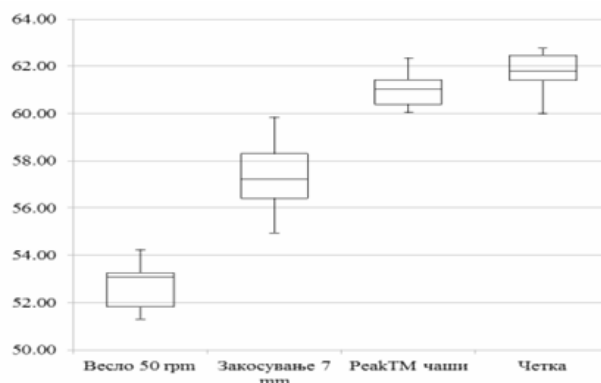
Табела 1. Резултати од ефектот на различни модификации на апарат 2 врз дисолуционите карактеристики на испитуваните примероци (Q претставува 'quartile')

Поради зголемување на текот на медиумот на дното од чашите и нарушување на купата, степенот на ослободена активна супстанца е зголемен со закоосување на чашата на $57.34 \pm 1.74\%$ (Слика 3).



Слика 3. Шематски приказ на дисолуцијата под стандардни услови и со закоосување на чашите. Адаптирано од T. Mirza et al, 2005 [5].

Со Peak™ чашите се ослободени $61.04 \pm 0.85\%$. Купата во Peak™ чашите не е статична и кружи на врвот на конвексното дно^[5]. Ова го објаснува поголемиот процент на ослободување и помалата варијабилност на резултатите. Со модифицираната мешалка добиени се $61.71 \pm 1.01\%$ на ослободена супстанца. Влакната од четката постојано го допираат дното и страните од чашата со што еднакво ја дистрибуираат и мешаат дезинтегрираната маса, избегнувајќи акумулација. Во модифицираните тестови на дисолуција, контактната површина помеѓу честиците на активната супстанца и медиумот е зголемена, а дебелината на дифузниот слој е намалена, што условува побрзо ослободување.



Слика 2. Box and whiskers график на ослободена активна супстанца со метод на весло и негови модификации.

ЗАКЛУЧОК

Примената на Апарат весло со 50 rpm за конкретен испитуваниот препарат не овозможува униформно мешање, поради појава на регии со слаба агитација и варијабилна хидродинамика, што доведува до високо варијабилни и непредвидливи резултати. Проблемите со хидродинамиката може да се намалат или избегнат преку едноставно зголемување на брзината на мешање, но понекогаш на сметка на дискриминаторната способност на тестот на дисолуција.

ЛИТЕРАТУРА

- Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 1997, <http://www.fda.gov/cder/guidance/1713bp1.pdf>.
- McCarthy, L. G.; Kosiol, C.; Healy, A. M.; Bradley, G.; Sexton, J. C.; Corngan, O. I. Simulating the Hydrodynamic Conditions in the United States Pharmacopeia Paddle Dissolution Apparatus. AAPS PharmSciTech 2003, 4, 172-187.
- Meyer, M. C.; Straughn, A. B.; Mhatre, R. M.; Shah, V. P.; Williams, R. L.; Lesko, L. J. Lack of In Vivo/In Vitro Correlations for 50 mg and 250 mg Primidone Tablets. Pharm. Res. 1998, 15, 1085-1089.
- Qureshi, S. A. Improved Drug Dissolution and Product Characterization Using the Crescent-shaped Spindle. J. Pharm. Pharmacol. 2004, 56, 1135-1141.
- T. Mirza et al., Evaluation of Dissolution Hydrodynamics in the USP, Peak and Flat-Bottom Vessels using Different Solubility Drugs, 2005, Dissolution Technol. 12, 11-16.

COMPARISON OF ION-PAIR HPLC AND HILIC METHOD FOR DETERMINATION OF CETYLPIRIDINIUM CHLORIDE IN PHARMACEUTICAL PREPARATION

N. Nakov, L. Bogdanovska, L. Ugrinova, M. Hadzieva, R. Petkovska, A. Dimitrovska

University "St. Cyril and Methodius", Faculty of Pharmacy, Center of drug quality control, Skopje, Macedonia

INTRODUCTION

Cetylpyridinium chloride (CPC) is classified as cationic surfactant and is one of the very important surfactants that is used in manufacturing of dermal ointments, drugs and cosmetics. As a quaternary ammonium compound cetylpyridinium has antibacterial activity, so it is widely used in formulations intended for treatment of mouth and throat infections. Determination of CPC could be performed by various methods: thin-layer chromatography (1), spectrophotometric (2), titration (3) and reverse-phase (RP) chromatography (4). As CPC belongs to the group of polar, basic molecules, it is difficult to retain it in conventional RP-chromatographic system and to be separated from the dead volume. Ion pairing reagents, in order to provide better retention, are often used as additives in RP analysis of cetylpyridinium. The most common disadvantages of using ion-pair reagents are long equilibration time, disturbance of equilibration by an injection, column cannot be used anymore for other ion-pair reagents, peak tailing for basic compounds, etc (5).

In the past few years hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) has steadily gaining interest as a option to RPLC for many applications dealing with polar and hydrophilic anilities. HILIC is a variant of NPC, but utilizes water (at least 3%) in water-miscible organic solvent (most often acetonitrile from 60% to 97%) as an eluent in conjunction with hydrophilic stationary phase (6,7). The aim of this work is to propose a HILIC method for determination of cetilpyridinium in pharmaceutical formulations and to compare it with ion-pair chromatographic method.

MATERIALS AND METHODS

Separation was performed on Agilent Rapid Resolution HPLC System 1200 Series. All measurements were made with flow rate of 1 ml/min, 10µl injection volume and UV detection at 254 nm.

HILIC Chromatographic conditions

Experiments were made using Purospher STAR Si 150 x 4.6 mm, 5µm particles column and acetonitrile : 20mM ammonium formate at pH4.0 in ratio 80:20 (v/v, %) as a mobile phase. Solvent used for HILIC method was acetonitrile : water in ratio 90:10 (v/v, %).

Ion-pair HPLC Chromatographic conditions

Novapak CN 150 x 4.6 mm, 5µm particles, column was used for the ion-pair HPLC method. Mixture of 3.6 ml 20% tetrabutylammonium hydroxide (TBAH) up to 950 ml water (pH 3.5) : methanol in ratio 40:60 (v/v, %) was used as a mobile phase. The mobile phase was used as a solvent for this chromatographic method.

Standard solution of cethylpyridinium chloride was prepared in concentration 0.025 mg/ml. Test solution was prepared from lozenges containing CPC.

RESULTS AND DISCUSSIONS

In the experiments for HILIC method for determination of CPC, we used ACN as it encourages retention of polar anilities compared to methanol as organic eluent. Ammonium formate in 20mM concentration was chosen as a buffer, because of its solubility in highly organic solvent content. Also, ammonium formate provides important counter ion concentration necessary for good peak shape, through improved kinetics and surface interactions. The conducted experiments shown that the optimal value for retention factor was obtained using mobile phase composition acetonitrile : ammonium formate (pH 4.0, 20mM) in ratio 80 : 20 (v/v). The representative chromatogram of the test solution obtained under optimized HILIC conditions is presented in Fig.1.

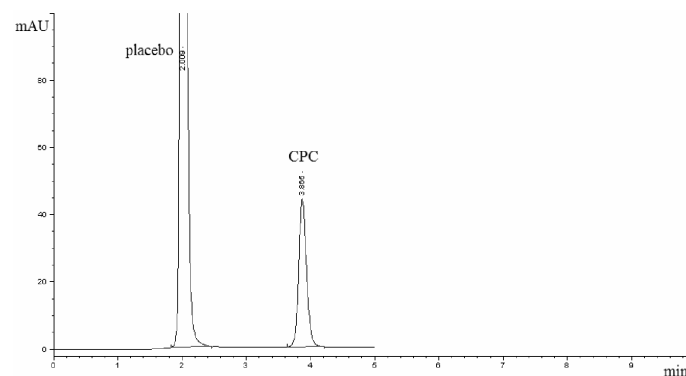


Fig.1 Chromatogram of test solution containing cetylpyridium (HILIC)

The ion-pair chromatographic method was conducted using TBAH as a ion-pair reagents, because quaternary ammonium compounds are most often used as a ion-pair reagents for attaining retention of CPC using CN column. The obtained chromatogram of the test solution by ion-pair HPLC method is presented on Fig.2.

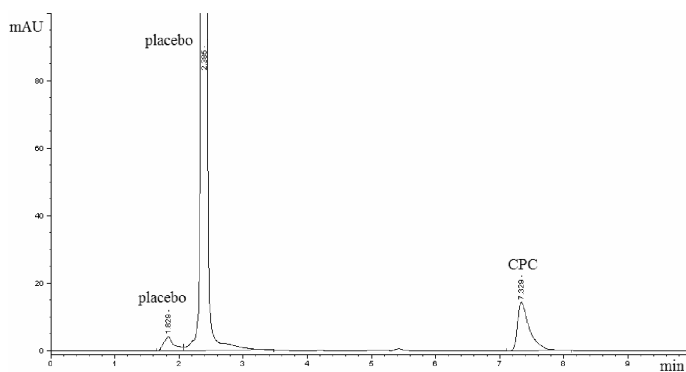


Fig.2 Chromatogram of test solution containing cetylpyridium (ion-pair HPLC)

In our work, comparison of the HILIC and ion-pair chromatographic method was done by comparing the retention time, capacity factor (k'), tailing, symmetry factor of the peak and the number of theoretical plates (N). The obtained values for the stated chromatographic parameters are presented in table 1.

Table 1 Values for the chromatographic parameters

	HILIC method	Ion-pair method
RT	3.9	7.3
k'	1.2	2.1
Tailing factor	1.2	2.1
Symmetry factor	0.8	0.4
N	5300	4800

HILIC method Ion-pair method RT 3.9 7.3 k' 1.2 2.1 Tailing factor 1.2 2.1 Symmetry factor 0.8 0.4 N 5300 4800

The HILIC method provided shorter retention time, better peak shape and column efficiency compared to the ion-pair HPLC method for determination of CPC. Comparison of the values for the chromatographic parameters, shown that HILIC method has a better chromatographic performances.

CONCLUSION

HILIC determination of cetylpyridinium on bare silica column using an ACN-ammonium formate buffer is effective technique that offers good retention without the need of ion-pair reagents. Also HILIC method provided better chromatographic performances than the ion-pair method and faster analysis time. This method offers an attractive, if not a superior alternative to RP-HPLC method for determination of cetylpyridin in pharmaceutical preparations.

REFERENCES

- 1.J.paesen,I.Quintens,G.Thoithi,E.Roets,G.Reybrouck,J.Hogmartens, 1994. J.Chromatogr.A 667, 377-384
- 2.M.Benamor, N.Aguersif, M.T. Draa, 2001. J. Pharm. Biomed.Anal. 26, 151-154
- 3.European Pharmacopeia 7.0, Consil of Europe, Strasbourg, France 2010
- 4.P.Linares, M.C.Gutierrez, F.Lazaro, M.D.Luque de Castro, M.Valcarcel, 1991. J. Chromatogr. 558, 147-153
- 5.L.R.Snyder, J.J.Kirkland, J.W.Dolan, 2010. Introduction to modern liquid chromatography John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, Canada 3th ed. 202
- 6.P.Hemstrom, K.Irgum, 2006. Hydrophilic interaction chromatography. J.Sep.Sci. 29, 1784-1821
- 7.D.McCalley, 2007. Is HILIC with silica columns aviable alternative to RPLC for analysis of ionisable compounds. J.Crom.A. 1171, 46-55

СПОРЕДБА НА ЈОН-ПАР НРЛС И НІЛІС МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ЦЕТИЛПИРИДИН ХЛОРИД ВО ФАРМАЦЕВТСКА ДОЗИРАНА ФОРМА

Н. Наков, Л. Богдановска, Л. Угринова, М. Хаџиева, Р. Петковска, А. Димитровска

Универзитет "Св.Кирил и Методиј", Фармацевтски Факултет, Центар за испитување и контрола на лекови, Скопје, Македонија

ВОВЕД

Цетилпирин хлорид (СРС) се класифицира како катјонски сурфактант и претставува еден од најзначајните сурфактанти кои што наоѓаат примена во производството на фармацевтски и козметички препарати. Цетилпирин, како квартерерна амониумова сол, поседува антибактериска активност и влегува во состав на голем број на препарати наменети за третман на инфекции на усната шуплина и

грлото. Литературните податоци укажуваат на постоење на различни техники за негово определување, како што се: тенкослојна хроматографија (1), спектрофотометрија (2), титрација (3) и реверзно-фазна хроматографија (4). СРС припаѓа на групата на поларни, базни молекули, поради што неговото определувањето на конвенционалните RP стационарни фази е отежнато, како резултат на неможност за негово разделување од мртвиот волумен (V_0) на стационарната фаза. Употребата на јон-пар реагенси во ваков случај е неопходна за обезбедување на ретенцијата на СРС при определување со RP-HPLC. Меѓутоа јон-пар хроматографските методи имаат голем број на недостатоци: долго време на стабилизација на колоната, нарушување на еквилибриумот со инјектирање, колоната не може да се користи со друг тип на јон-пар реагенси, несиметричност на пикови на базни компоненти и друго (5). Во последните години, хидрофилна интеракција течна хроматографија (HILIC) добива се поголемо значење како опција на јон-пар LC за определување на поларни аналити. HILIC е варијанта на NPC, со таа разлика што мобилната фаза се состои од мал процент на вода (најмалку 3%) во смеса со голем процент на поларен органски растворувач (6,7). Целта на нашето истражување е да понудиме HILIC метод за определување на СРС во фармацевтски дозирани форми, како и да направиме споредба со јон-пар HPLC метод.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Експериментите се изведени на Agilent Rapid Resolution HPLC Систем, серија 1200. Сите мерења се направени со прокот од 1 ml/min, 10µl волумен на инјектирање и UV-детекција на 254 nm.

HILIC Хроматографски услови

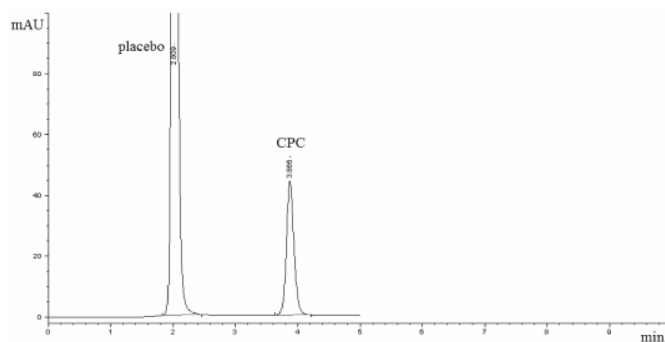
Хроматографското разделување е извршено на колона Purospher STAR Si со димензии 150 x 4.6 mm, 5µm и ацетонитрил (ACN): 20 mM амониум формат (pH4.0) во однос 80:20 (v/v, %) како мобилна фаза. Како растворувач користевме смеса од ацетонитрил:вода во однос 90:10 (v/v, %).

Јон-пар HPLC Хроматографски услови

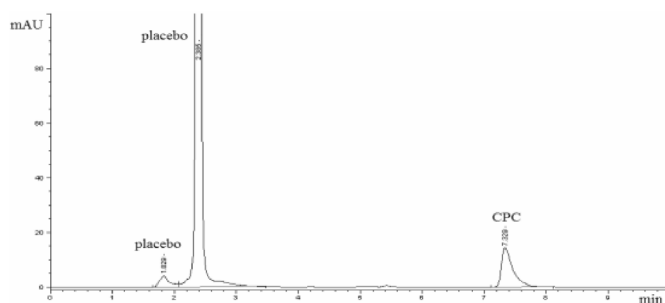
Експериментите се направени на Novarac CN колона со димензии 150 x 4.6 mm, 5µm и смеса од 3.6 ml 20% тетрабутиламониум хидроксид (ТВАН) до 950 ml вода (pH 3.5) и метанол (МОН) во однос 40:60 (v/v, %) како мобилна фаза, при што мобилната фаза претставуваше и раствор во овој случај. Користевме стандарден раствор на СРС во концентрација од 0.025 mg/ml и раствор на анализа во иста концентрација подготвен од пасти кои содржат СРС.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Во експериментите за HILIC определување на СРС користевме ACN како органски елуент, бидејќи овозможува поголема ретенцијата на поларни аналити во однос на МОН. Со оглед на фактот што амониум формат во концентрација од 20mM има голема растворливост во присуство на висок процент на органски растворувач, истиот беше избран како пуфер. Дополнителна предност е што обезбедува доволна количина на каунтер-јон, неопходна за добра симетрија на пикот, преку подобрена кинетика и површински интеракции. Спроведените експерименти покажаа дека оптимални вредности за факторот на ретенција (k') се постигнуваат користејќи ACN: амониум формат (pH 4.0, 20mM) во однос 80:20 (v/v, %). Хроматограм од пробниот раствор добиен под HILIC услови е прикажан на слика 1.



Слика 1 Хроматограм на пробен раствор (HILIC)
За јон-пар HPLC методот користевме ТВАН, бидејќи квартернерните амониумови соли се најчесто користени јон-пар реагенси за зголемување на ретенцијата на CPC на CN колона. Хроматограм од пробниот раствор добиен со јон-пар HPLC метод е прикажан на слика 2.



Слика 2 Хроматограм на пробен ратсвор (јон-пар HPLC)

Споредбата на овие два метода ја направивме споредувајќи го времето на ретенција (RT), факторот на ретенција (k'), фактор на развлекување (A_s) и симетрија на пикот, како и бројот на теоретски подови (N). Добиените вредности се прикажани во табела 1.

	HPLC метод	Јон-пар метод
RT	3.9	7.3
k'	1.2	2.1
A_s	1.2	2.1
Фактор на симетрија	0.8	0.4
N	5300	4800

Табела 1 Вредности за хроматографски параметри

HILIC метод Јон-пар метод RT 3.9 7.3 k' 1.2 2.1 A_s 1.2 2.1 Фактор на симетрија 0.8 0.4 N 5300 4800

Споредбата на хроматографските параметри покажа дека HILIC методот обезбедува пократко време на ретенција, подобра симетрија на пикот и поголема ефикасност на колоната во однос на јон-пар HPLC методот.

ЗАКЛУЧОК

HILIC определувањето на CPC на силика колона користејќи ACN-амониум формат како мобилна фаза, претставува ефикасна техника која што овозможува ретенција на поларни компоненти без употребата на јон-пар реагенси. HILIC методот дава подобри

хроматографски перформанси во однос на јон-пар HPLC методот, како и скратување на времето потребно за спроведување на анализата. Може да се заклучи дека овој метод е супериорна алтернатива на јон-пар HPLC методот за определување на CPC во фармацевтски препарати.

РЕФЕРЕНЦИ

1. J. J. Paesen, I. Quintens, G. Thoithi, E. Roets, G. Reybrouck, J. Hogmartens, 1994. J. Chromatogr. A 667, 377-384
2. M. Benamor, N. Aguersif, M. T. Draa, 2001. J. Pharm. Biomed. Anal. 26, 151-154
3. European Pharmacopeia 7.0, Conseil of Europe, Strasbourg, France 2010
4. P. Linares, M. C. Gutierrez, F. Lazaro, M. D. Luque de Castro, M. Valcarcel, 1991. J. Chromatogr. 558, 147-153
5. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan, 2010. Introduction to modern liquid chromatography John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, Canada 3th ed. 202
6. P. Hemstrom, K. Irgum, 2006. Hydrophilic interaction chromatography. J. Sep. Sci. 29, 1784-1821
7. D. McCalley, 2007. Is HILIC with silica columns viable alternative to RPLC for analysis of ionisable compounds. J. Chrom. A. 1171, 46-55

EXPERIMENTAL DESIGN OF STRESS TESTING STUDY FOR DOUBLE ACTIVE COMPONENT SYSTEM IN DRUG PRODUCT

Ivana Mickoska, Aleksandra Jovanovik, Biljana Šapkareva, Sonja Ugarkovik, Nataša Anevska-Stojanovska

Research and Development, ALKALOID AD, Aleksandar Makedonski 12, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

INTRODUCTION

Skopryl plus tablets is a genuine brand product of ALAKLOID AD, Skopje, being advanced pharmaceutical formulation used for suppression and control of high blood pressure (hypertension). It incorporates two active pharmaceutical ingredients (API): Lisinopril dihydrate and Hydrochlorothiazide. Lisinopril Dihydrate is API which belongs in the group of angiotensin converting enzyme inhibitors, while Hydrochlorothiazide is thiazide group diuretic.

AIM OF THE STUDY

Main objective of this study was to provide information about degradation pathways of both APIs used in the formulation *Skopryl plus* tablets and to investigate the selectivity of the applied HPLC analytical methods (Analytical Procedures for Assay of Related and Degradation products deriving from Lisinopril Dihydrate and the other one, Assay of Related and Degradation products deriving from Hydrochlorothiazide). For the purpose of the experiment, dedicated stress testing study was conducted.

REGULATIVE PERSPECTIVES

According to the ICH and FDA guidance documents, stress testing is conducted to fulfill three main purposes:

1. To provide a stability assessment of the drug product.
2. To elucidate the possible degradation pathway of the API in the drug product.
3. To investigate the stability-indicating power of the analytical procedures applied for the drug product.

However, it is generally recognized that during stress testing, degradation products can be observed that are not formed during acceler-

ated or long-term stability studies. The requirements for establishing relevant stress conditions can be summarized as below:

1. Should lead to the degradation of the main compound, but not more than 5-15%.
2. Should lead to a good predictability of degradation pathways (*i.e.*, a low probability of "drastic" or "false" degradation).
3. Should be conducted for no longer than three months.

Generally, the stress testing should induce not more than 5-15% degradation of the main components. A stress test should be stopped when this percentage of degradation is achieved. In particular, the issue of how much stress is adequate in stress testing is not addressed specifically.

Overstressing a molecule can lead to degradation profiles that are not representative of real storage conditions and perhaps not relevant to method development.

Therefore, stress-testing conditions should be realistic and not excessive. General protocol for stress studies (stress testing) of drug substances and drug products is presented in Table 1.

Table 1. General protocol for establishing stress study of API and drug product

	Drug substance		Drug product	
	Solid	Solution	Solid	Solution
Acid/base		√		×
Oxidative	×	√	√	√
Photostability	√	×	√	√
Thermal	√		√	√
Thermal/humidity	√		√	

√-recommended, X-optional

RESULTS AND DISCUSSION

The designed protocol as well as the obtained results by HPLC analysis for the stress study in the case of the *Skopryl plus* tablets are presented in table 2.

	Stress conditions	Degradation (%)	
		Hydrochloro.	Lisinopril
Thermal	105 °C for 72h	4.65	4.65
Light	765 W/h ² for 35h	0.36	0.16
Thermal and humidity	40 °C/75%RH for 40 days	1.51	0.17
Oxidative	5 ml 20% H ₂ O ₂ /50°C for 3h	3.41	0.47

Table 2. The stress study protocol and the obtained results

Following observations might be pointed out:

- » The amount of benzothiadiazine (*Related Compound A*) was found growing when the drug product was exposed at influence of higher temperature, humidity and oxidative solution.
- » Increase of the amount of Clorthiazide was observed when the product was exposed at influence of higher temperature, light and oxidative solution;
- » Unknown impurity with Relative retention time 2.21 was formed when the drug product was exposed under the influence of light of 765W/h²; 35 hours.
- » The amount of Lisinopril Diketopiperazine (*Related Compound A*) was growing when the drug product was exposed at influence of higher temperature;
- » Unknown impurities with Relative retention times: 1.16, 1.91, 2.61 and 3.85 were formed when the drug product was exposed under the oxidative solution (20% H₂O₂, 3 hours at 50 °C).

The obtained results from stress testing studies were used to assess drug product stability, to provide information about possible degradation pathways, and to demonstrate the stability-indicating capability of the analytical method used.

The purity plot show that the both active ingredients Lisinopril Dihydrate and Hydrochlorthiazide peaks are homogenous and this is confirmed for all above stressed conditions where the degradation products does not interfere.

CONCLUSION

It was concluded that the HPLC method used for determination of related degradation products in *Skopryl plus* tablets, has shown good selectivity and is stability indicating. This HPLC method can be used in determination of potential known and unknown impurities which can be formed during the degradation process of the incorporated APIs.

REFERENCES

1. D. W. Reynolds, K. L. Facchine, J. F. Mullaney, K. M. Alsante, T. D. Hatajik, M. G. Motto "Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies", *Pharmaceutical Technology* (www.pharmtech.com, February 2002).
2. Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, (November 1996).
3. S. Klick, P. G. Muijselaar, J. Waterval, T. Eichinger, C. Korn, T. K. Gerding, A. J. Debets, C. Sanger-van de Griend, Cas van den Beld, G. W. Somsen, G. J. De Jong Motto "Toward a Generic Approach for Stress Testing of Drug Substances and Drug Products", *Pharmaceutical Technology* (www.pharmtech.com, February 2005).

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДИЗАЈН НА СТРЕС СТУДИЈА НА ТАБЛЕТИ СО ДВО- КОМПОНЕНТЕН СИСТЕМ ОД ФАРМАЦЕВТСКИ АКТИВНИ СУПСТАНЦИ

Ивана Мицкоска, Александра Јовановиќ, Билјана Шапкарева, Соња Угарковиќ, Наташа Аневска-Стојановска

Истражување и развој, АЛКАЛОИД АД, Александар Македонски 12,
1000 Скопје, Република Македонија

ВОВЕД

“Skopryl plus” таблети, производ на Алкалоид АД Скопје, е напредна фармацевтска формулација која се употребува за намалување и контрола на високиот крвен притисок. Како фармацевтски активни соединенија (ФАС) содржи комбинација од Lisinopril dihydrate и Hydrochlorthiazide. Lisinopril dihydrate припаѓа во групата на инхибитори на ангиотензин конвертирачки ензими, додека Hydrochlorthiazide припаѓа во групата на тиазидни диуретици.

ЦЕЛ НА СТУДИЈА

Главната цел на оваа студија е да се обезбедат информации за патот на деградација на двете активни компоненти вклучени во формулацијата на “Skopryl plus” таблетите и да се испита селективноста на применетите HPLC методи за анализа (две посебни аналитички процедури за анализа на деградациони производи кои протекнуваат од Lisinopril dihydrate и Hydrochlorthiazide, соодветно). За потребите на експериментот, беше спроведена детална стрес тест студија.

РЕГУЛАТИВА

Според документите на ICH и FDA водичите, стрес тестот се спроведува за да се исполнат три главни цели:

- » Да се обезбеди проценка за стабилноста фармацевтскиот производ.
- » Да се објасни можниот пат на деградација на активната компонента во фармацевтскиот производ.
- » Да се испита релевантноста и да се процени моќта на аналитичката метода за следење на сродните и деградациските кај финалниот производ.

Бидејќи, општо е познато дека за време на стрес тестот, се забележува формирање на деградациони производи кои не се формираат за време на забрзаните или долгорочните стабилносни студии, постојат соодветни препораки за создавање на релевантни стрес услови. Секој избран стрес условите треба да ги исполни следните критериуми:

- » Да води кон деградација на главната компонента, но не повеќе од 5-15%.
- » Да води кон добра предвидливоста на патот на деградација (т.е. ниска веројатност на “драстична” или “лажна” деградација).
- » Да се одвива во период не подолг од три месеци.

Општо земено, стрес тестот не треба да предизвикува повеќе од 5-15% деградација на главните компоненти. Стрес тестот треба да се запре кога овој процент на деградација ќе биде постигнат. Прашањето за тоа колку е соодветен стресот во стрес тестот не е конкретно упатено. Престресирани молекула може да доведе до

профили на деградација кои не се репрезентативни за вистинските услови на чување, а можеби и не се релевантни за развојот на методот. Затоа, стрес условите треба да бидат реални и да не се екстремни. Генералниот протокол за стрес студиите (стрес тестот) на супстанции и финални фармацевтски производи е прикажан во Табела 1.

Табела 1. Генерален протокол за воспоставување на стрес услови на ФАС и фармацевтски препарат

	ФАС		Фар. производ	
	Цврста	Течна	Цврста	Течна
Киселина/База		√		X
Оксидација	X	√	√	√
Фотостабилност	√	X	√	√
Термичка	√		√	√
Термичка/Влага	√		√	

√-се препорачува, X-од избор

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Дизајнираниот протокол за стрес студијата во случајот на “Skopryl plus” таблети, како и добиените резултати со HPLC анализата се презентирани во Табела 2.

Табела 2. Протокол за изведената стрес студија и добиени резултати

	Стрес услови	Деградација (%)	
		Hydrochloro.	Lisinopril
Термичка	105 °C за 72h	4.65	4.65
Светлина	765 W/h ² за 35h	0.36	0.16
Термичка и влага	40 °C/75%RH за 40 дена	1.51	0.17
Оксидација	5 ml 20% H ₂ O ₂ /50°C за 3h	3.41	0.47

Од приложените податоци се гледа дека:

- » Расте содржината на Benzothiadiazine (*Related Compound A*) кога производот е изложен на повисока температура, влажност и оксидациски услови (во раствор).
- » Пораст на содржината на Clorthiazide кога производот е изложен на влијание на повисока температура, светлина и оксидациски услови (во раствор).
- » Непознато онечистувања со релативно време на задржување 2,21 беше формирано кога лек производот беше изложен под влијание на светлина од 765W/h² во времетраење од 35 часа.
- » Содржината на Lisinopril Diketopiperazine (*Related Compound A*) се зголемува кога лек производот е изложен под влијание на повисока температура.
- » Непознати онечистувања со релативни времиња на задржување: 1,16, 1,91, 2,61 и 3,85 се формираат кога лек производот е изложен под дејство на оксидациски услови (20% p-ор. на H₂O₂, 3 часа на 50 °C).

Добиените резултати од стрес тест студијата се користат за: оценување на стабилноста финалниот производ, обезбедување на информации за можните патишта на деградација и за докажување на релевантноста и моќта на аналитичката метода за следење на

сродните и деградациските.

Параметрите за чистотата на пиковите покажуваат дека пиковите од двете активни компоненти Lisinopril dihydrate и Hydrochlorthiazide се хомогени и ова е потврдено за сите погоре наведени услови. Тоа исто така е директен доказ дека деградациските производи не се мешаат меѓусебно.

ЗАКЛУЧОК

Од добиените резултати може да се заклучи дека применетите HPLC методи кои се користат за одредување на деградациските производи во "Skopryl plus" таблети, покажуваат добра селективност и стабилност. Овие HPLC методи може да се користат при утврдување на потенцијални познати и непознати нечистувања кои може да се формираат во текот на процесот на деградација на активните компоненти.

РЕФЕРЕНЦИ

- [1]. D. W. Reynolds, K. L. Facchine, J. F. Mullaney, K. M. Alsante, T. D. Hatajik, M. G. Motto "Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies", Pharmaceutical Technology (February 2002).
- [2]. Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, (November 1996).
- [3]. S. Klick, P. G. Muijselaar, J. Waterval, T. Eichinger, C. Korn, T. K. Gerdling, A. J. Debets, C. Sanger-van de Griend, Cas van den Beld, G. W. Somsen, G. J. De Jong Motto "Toward a Generic Approach for Stress Testing of Drug Substances and Drug Products", Pharmaceutical Technology (February 2005).

COMPARATION OF EXTRACTION EFFICIENCY OF DIFFERENT ORGANIC SOLVENTS FOR SIMPLIFICATION OF DIMENHYDRANATE COMPONENTS QUANTIFICATION

M. Piponski, M. Naumovska, I. S. Slavevska, T. Ru-sevska, I. Mitreski, G. T.-Serafimovska

Pharmaceutical Company Replekfarm - Quality Control Department

INTRODUCTION

The quantitative determination of Dimenhydranate, Diphenhydramine and 8-Chlorotheophylline components is known to be very complex, harmful and tedious in described Pharmacopoeias monographies. It should be performed with many repeated Liquid-Liquid Extraction (LLE) on the crushed samples. This is especially unpleasant situation when a large number of samples should be performed, like daily control, stability studies, dissolution testing

AIM OF WORK

was to investigate a possibility to avoid, skip or replace the repeated LLE preparation of active ingredients in Dimenhydranate tablets and to establish a concept for healthier, faster, green-er and cheaper method for quantitative analysis of this product

METHODS AND INSTRUMENTS

A single organic solvent extraction of crushed and powdered tablets were concepted and performed with testing the uses of methanol, ethanol, isopropanol, chloroform, and mixture of tetrahydrofuran-isopropanol with appropriate acidification. The samples were

ultrasound treated and after filtration directly injected in integrated HPLC system Varian 920 with DAD, controlled with Galaxy 1.9 Version. The used column was LiChrosphere RP Select B 125 x 4 mm with 5µm particles, with simple in-house developed and modified HPLC method for quantification, which does not use solid substance added for buffering and without filtration of mobile phase

RESULTS AND CONCLUSION

After testing of 5 different organic extraction mediums, we found very similar extraction efficiencies of more polar solvents, then with less polar solvents. The low polarity solvents besides no extraction recovery advantages, impairs the peak shapes in chromatograms and often induced impaired baseline stabilities. This high quantitative recoveries of more polar aliphatic alcohols suggest and prompt the concepts for developing analytical method for Dimenhydranate without LLE steps in sample preparation before injection in HPLC.

REFERENCES

- 1, EP 7
- 2, Clarke's Isolation and Characterisation of Drugs

СПОРЕДБА НА ЕКСТРАКЦИОНАТА ЕФИКАСНОСТ НА РАЗЛИЧНИ ОРГАНСКИ СОЛВЕНТИ ЗА СИМПЛИФИКАЦИЈА ПРИ КВАНТИФИКАЦИЈА НА КОМПОНЕНТИТЕ НА ДИМЕНХИДРАНАТ

М. Пипонски, М. Наумовска, И. С. Славевска, Т. Русевска, И. Митревски, Г.Т.-Серафимовска

Фармацевтска Компанија Реплекфарм – Реплек, Сектор за Контрола на Квалитет, Скопје, Р. Македонија

ВОВЕД

Квантитативното одредување на компонентите на Дименхидранат, Дифенхидрамин и 8-Хлоротеофиллин е опишано и познато како прилично комплексно, штетно и макотрпно со повеќекратна течно-течна екстракција (ТТЕ) на пулверизираниот примерок. Ваквите припреми се посебно непожелни и непријатни во ситуациите кога голем број на примероци треба да бидат анализирани во текот на денот, како на пример во големиот број на дневно пристигнати производни и развојни анализи, при студии на стабилност, при испитувањата на растворливостите.

ЦЕЛ НА ТРУДОТ

Целта беше да се испита можноста за избегнување, прескокнување или замена на повеќекратната ТТЕ на активните ингридиенти во таблетите и да се воспостави концепт за поздрав, побрз, поеколошки и поефтин метод за квантитативна анализа на овој продукт.

МЕТОДИ И ИНСТРУМЕНТИ

Еднократна органско-солвентна екстракција на пулверизиран материјал од таблети беше замислен и реализиран преку тестирање на метанол, етанол, изопропанол, хлороформ и мешавина од тетраhydroфуран и изопропанол, со одредено закиселување. Примероците беа третирајани на ултразвучна бања, филтрирани и

инјектирани директно во интегриран HPLC систем модел Varian 920 со DAD, контролиран од софтвер Galaxy верзија 1.9. Користена беше колона LiChrospher RP Select B 125x4mm со 5µm партикли и користена беше наша интерно развиена HPLC метода за квантификација која не користи цврсти супстанции за пуферирање кои треба потоа да се филтрираат.

РЕЗУЛТАТИ И ЗАКЛУЧОК

После 5 тестирани различни органски течни медиуми, утврдивме многу повеќе слични екстракциони ефикасности на повеќеполарните солвенти, отколку на оние добиени со пониска поларност. Користењето на понискополарните органски солвенти, покрај тоа што не покажа никаква предност во приносот на екстракцијата покажа и друга неповолна страна – неподобно влијание на обликот на пиковите во хроматограмите и стабилностите на нивните базни линии. Повисоката екстрактивна ефикасност на повисоко поларните алифатични алкохоли ни асоцира и не поттикнува на концептуализирање на аналитички метод за квантификација на Димехидранат без користење на штетните повеќекратни ТТЕ.

ЛИТЕРАТУРА

- 1, EP 7
- 2, Clarke's Isolation and Characterisation of Drugs

ADOLOR GRIPO C AS COLD MEDICINE PREPARATION – A REAL AND PERMANENT ANALYTICAL CHALLENGE

M.Piponski, T.Rusevska, I.S.Slavevska, B.Vulovska, M.Mindoseva, M.Petreska, G.T.-Serafimovska
Pharmaceutical Company Replekfarm-Replek Skopje, Quality Control Department, Skopje

INTRODUCTION

A famous pharmaceutical complex preparation known as Cold Medicine formulations, have always been a challenge for analyst's and prone to further method improvements from the aspects of simplicity, speed, peak shape and resolution and sensitivity of chromatographic separations, without sacrificing of the accuracy and reproducibility and ruggedness of the method.

AIM OF WORK

The employing of chromatographic theory, rules and experience throw conceptualisation of experimental variables, manifested with many considered combinations of buffers, amino modifiers and organic solvents, to create simplest, fastest and best system suitability HPLC method for separation of four components, Ascorbate, Paracetamol, Caffeine and Chlorpheniramine with isocratic elution in solid pharmaceutical dosage forms.

METHOD AND INSTRUMENTS

Separation optimisations were performed with Varian HPLC systems with DAD, models ProStar modular and integrated Model 920, controlled with Galaxy 1.9 Version 1.9. Many different mobile phase compositions were composed of combinations of methanol, acetonitrile, UV-transparent amino modifiers and phosphate buffers with different concentrations and pH values. Adding and omitting of amino-modifiers was compared, different RP bonded phases, i.e.

columns with C8 and C18 matrixes made from different vendors were checked and compared, like LiChrospher, Purospher from Merck and Discovery from Supelco. The chromatogram quality was estimated by following peaks shapes, resolutions, base line stabilities with calculating their system suitability parameters. All this variables should generate simple, accurate, sensitive, reproducible and as much as possible rugged method

RESULTS AND CONCLUSION

The best result we got with the column Discovery LC-8 column 150x4,6mm with 5µm particles, with equal parts of methanol and acetonitrile with dominant part of 25mM phosphate buffer at pH=2.3 with 0,2% of diisopropylamine. Since the enormous differences in the peaks sizes of constituents, especially Paracetamol and Chlorpheniramine induced from their molar absorptivity and mass participation, it was concluded and suggested in aim to achieve high sensitivity and accuracy, the quantification of all 4 components to be performed with 2 very similar methods which differ in the percentage of organics in mobile phase and monitored UV signal. The same column and buffer are recommended and used. The separation with perfect resolutions and peak shapes is easily achieved one mobile phase, but the accuracy of the method is little jeopardized with the peak height differences, for Paracetamol 1350 mAU, compared with Chlorpheniramine with less than 10mAU.

REFERENCES

- 1, USP32-33
- 2, BP2011
- 3, Clarke's Drug Isolation and Characterisation of Drugs

АДОЛОР ГРИПО Ц ОД ГРУПАТА НА COLD-ПРЕПАРАТИ; ВИСТИНСКИ И ПОСТОЈАН ПРЕДИЗВИК ЗА АНАЛИТИЧКИ ИСТРАЖУВАЊА

М. Пипонски, Т. Русевска, И. С. Славевска, Б. Вуловска, М. Миндошева, М. Петреска, Г.Т.-Серафимовска

Фармацевтска Компанија Реплекфарм – Реплек, Сектор за Контрола на Квалитет, Скопје, Р. Македонија

ВОВЕД

Познатиот фармацевтски комплексен препарат од групата на Cold-Формулации, отсекогаш бил аналитички предизвик и подложен на понатамошни методолошки подобрувања од аспект на едноставност, брзина, симетрија и резолуција на хроматографски пикови, како и сензитивност на методата без притоа да се жртвува точноста и репродукцибилноста, како и ригидноста на самата метода.

ЦЕЛ НА ТРУДОТ

Со примена на достигнувањата на хроматографската теорија, правила и искуство, низ концептуализирање на експериментални варијабли како различни комбинации на пуфери, аминоксидификатори и органски солвент и микстура, со цел да се направи наједноставен, најбрз метод со најдобри соодветни хроматограмски карактеристи-

ки во сепарацијата на четирите компоненти Ascorbat, Paracetamol, Caffeine и Chlorpheniramine во цврсто-дозажен фармацевтски препарат.

МЕТОД И ИНСТРУМЕНТИ

Сепарационите оптимизации беа изведувани на Varian-ови HPLC системи и тоа модуларен Pro-Star и интегриран модел 920 со DAD, контролирани од софтвер Galaxy верзија 1.9. Многу различни состави на мобилни фази беа конципирани и тестирани со микстури на метанол и ацетонитрил. Користени беа и тестирани UV-транспарентни amino-модификатори во различни концентрации и pH вредности. Додавање и изоставање на амините беше споредувано при различни RP сорбенти во колони спакувани со C8 и C18 матрикси произведени од различни производители. Конкретно беа тестирани производите на Merck од типот на LiChrospher, Purospher Star, Select B и од компанијата Supelco колоните од генерацијата Discovery. Квалитетот на хроматограмот беше интерпретиран преку облик и симетрија на пик, резолуција, стабилност на базна линија, параметри кои се составен дел на параметрите Системска Подобност. Сите овие варијабли требаше да генерираат еден едноставен, точен, сензитивен, репродуктивен и колку што е можно поригиден метод.

РЕЗУЛТАТИ И ЗАКЛУЧОК

Најдобри резултати се постигнаа со колоната Discovery LC-8 150 x 4,6 mm и 5 μm партикли, при еквиволуменско учество на метанол и ацетонитрил во мобилна фаза со доминантен удел на 25 mM фосфатен пуфер при pH=2.3 и додаден 0.2% диизопропиламин. Поради енормната разлика во големината на хроматографските пикови на Paracetamol-от и Chlorpheniramine-от, условена од големите разлики во масениот удел во таблетите и разликите во моларните апсорптивности дојдовме до заклучок дека најдобро е овие четири компоненти да бидат одредувани со две слични методи, кои меѓусебно се разликуваат само во јачината и составот на мобилната фаза. Оваа потреба од постоење на две методи е поради енормната разлика во височината на пиковите на гореспомнатите компоненти, додека Paracetamol-от излегува над линеарниот ранг на детекторот (1350 mAU), Chlorpheniramine-от тешко достигнува доволно прецизно и репродуктивно ниво (15-18 mAU). Поради овие детекциони разлики три компоненти се одредуваат со една мобилна фаза со 10-15% помалку органски растворител и три пати помал инјекционен волумен, додека Chlorpheniramine-от има метод со похидрофобна мобилна фаза, поголем инјекционен волумен и поголем проток. Сите останати варијабли, концентрација на пуфер, pH и колона се идентични во двата методи.

ЛИТЕРАТУРА

- 1, USP32-33
- 2, BP2011
- 3, Clarke's Drug Isolation and Characterisation of Drugs

AZITHROMYCINE HPLC QUANTIFICATION METHOD – CONCEPTS AND TESTING OF EXPERIMENTAL VARIABLES

M.Piponski, M.Globocki, I.S.Slavevska, T.Rusevska, B.Vulovska, G.Trendovska-Serafimovska

Pharmaceutical Company Replekfarm –Replek Skopje, Quality Control Department

INTRODUCTION

A big molecule of Azithromycine always needs maximal precautions and more care and experience for its quantification methods. Relative high Mw, lack of strong UV chromophore almost without UV spectrum, slow diffusion rate at ambient temperature, strong interaction with RP bonded phases C8 and C18, need excessive care in performing analytical methods of this analyte.

AIM OF WORK

It is always beneficial to test any new ideas and changes in HPLC operational parameters when Azithromycin comes for chemical analysis for continuous improvement of the simplicity, harness, reproducibility, sensitivity and ruggedness of the analytical method, especially when large number of analysis should be done in one day, many batch or lots of series, solubility testing, many new technological formulations. Testing of many different and UV-transparent buffering substances with different concentrations, pH values, organic solvents and their combination of mixture, different stationary RP matrix from different vendors, always bears a new moments and situations, ideas for creating simpler, faster, healthier and cheaper method with better chromatogram and without sacrifice of the main demands of the analysis, accuracy, sensitivity, reproducibility and maximal ruggedness.

METHOD AND INSTRUMENTS

All chromatographic analyses were performed on two different HPLC systems Varian, modular edition model ProStar and integrated model 920 with DAD, both controlled from Galaxy Version 1.9. We tested and found very different combinations of mobile phase constituents, organics, buffer substances, an ion-pair reagents and amino-modifiers. A plenty of HPLC columns tested were from stabile RP modified silica of high purity and broad range of pH use at 1.5-10 even up to 60°C. Our columns were products of Merck, Purospher C8 and C18 from 55mm up to 250 x 4 mm with 5 μm particles, and Gemini NX-C18 from Phenomenex with 250x4,6mm, 5μm.

RESULTS AND CONCLUSION

Depending on the target in the Azithromycine determinations demands, the column length was chosen for appropriate separation needs. In our investigation work we found that the cheapest pH and temperature stable RP bonded phase columns Purosphere C8 and C18 generate better chromatogram than the more expensive in our conditions. The fastest run was for less than 2 minutes was achieved with Purospher C8eSTAR 55 x 4 mm with 5μm, worked at 45°C and 10μl injection volumes, with peak symmetry AsUSP=1.1. The mobile phase was dominant mixture of organics, mixed with 25mM phosphate buffer at pH=7.4. The flow rate was 1.4ml/min and peak height about 130mAU for determination of content and more than 60mAU for solubility

testing samples. For determination of related compounds and degradation products, replacement of C8eSTAR with more hydrophobic and retentive C18eSTAR with longer dimensions 125 to 250mm, showed very good separation power, selectivity and stability. These methods can be readily redesigned in situation of lack of selectivity and resolution, moderating the run length, and maximizing samples throughput per day. Purospher RP sorbents confirmed their stability and applicability at extreme working conditions of pH and Temperature, supporting their values with lowest available prices for such chromatography matrixes. One of the most important feature was achievement of perfect peak symmetry for Azithromycine, as a result of highest purity of silica material for creating bonded RP columns, which result in much better sensitivity, accuracy, precision, repeatability and ruggedness of the method.

REFERENCES

1. USP33
2. BP2011
3. EP7

АЗИТРОМИЦИН HPLC КВАНТИФИКАЦИОНЕН МЕТОД – КОНЦЕПТИ И ТЕСТИРАЊА НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ВАРИЈАБЛИ

М. Пипонски, М. Глобочки, И.С. Славевска, Т.
Русевска, Г.Т-Серафимовска

*Фармацевтска компанија Реплекфарм – Реплек, Сектор за Контрола
на Квалитет, Скопје, ул Козле 188, Р. Македонија*

ВОВЕД

Големиот молекул на Азитромицин отсекогаш барал максимално внимание, предострожност и искуство за неговата квантификациона метода. Релативно големата молекулска маса, недостатокот од интензивна UV хромософа без воопшто присутен апсорпционен спектар, спората дифузија при амбиентална температура, силната интеракција со RP врзаните сорбенти C8 и C18 бараат големо внимание при изведбата на неговата аналитичка детерминациона метода.

ЦЕЛ НА ТРУДОТ

Отсекогаш било корисно да се истестира секоја нова идеја и промена во HPLC оперативните параметри при анализирањето на Азитромицин примероци, со цел континуирано да се подобрува едноставноста, штетноста, репродукцибилноста, сензитивноста и ригидноста на аналитичкиот метод, посебно кога голем број примероци треба да бидат испитани за кратко време, при интензивирани продукциони услови, тестирања на растворливост, студии на стабилност, брзи евалуации на технологии и суровини. Тестирањето на повеќе разлучни UV-транспарентни пуферирачки супстанции при различни концентрации и рН вредности, органски солвент и нивни микстури, различни стационарни сорбенти од различни фирми, секогаш продуцираат нови моменти и ситуации, идеи за креирање поедноставни, побрзи, поздравни и поефтини методи со подобри хроматограми, без загрозување на главните

таргети на анализите, нивната точност, сензитивност, репродукцибилност и максимална ригидност.

МЕТОДИ И ИНСТРУМЕНТИ

Сите хроматографски анализи беа изведувани со два различни методи на HPLC системи на Varian и тоа модуларен Pro-Star и интегриран модел 920 со DAD контролирани со софтвер Galaxy верзија 1.9. Тестиравме и утврдивме многу различни комбинации на мобилно-фазни состојки, органски растворувачи и микстури, пуферски супстанции, јон-пар реагенси и аминоксидификатори. Повеќето од тестираните HPLC колони беа од RP природа, кои беа набавени како рН 1,5-10 и температурно стабилни до 60°C сорбенти. Колоните беа продукти на Merck од типот на LiChrospher и Purospher Star-e C8 и C18, Select B, со должини 55-250mm и 5um партикли, како и Gemini NX-C18 од Phenomenex со димензии 250 x 4,6mm и 5um честички.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Зависно од целта при Азитромицин детерминационите барања должината на колоната беше соодветно избрана за адекватните сепарациони потреби. Во нашите испитувања утврдивме дека најевтините рН и терморезистентните RP врзани колони беа Purospher C8eStar и C18eSTAR, со димензии 55 x 4 mm и 5 um партикли на 45°C и 10ul инјекционен волумен на 214nm и достигната симетрија од AsUSP=1.1. Користената мобилна фаза беше доминантно од органско-солвентна миксура на ацетонитрил и метанол, соодветно измешана и припремена со 25mM калиумфосфатен пуфер со рН 7.4. Протоколот низ колоната беше 1.4 mL/min при што пикот на Азитромицинот достигна и до 120 mAU во проби за одредување содржини и до 60 mAU во пробите за одредување растворливост. За одредување на сродни и деградациони продукти замената на C8eSTAR со похидрофобната и поретентивна C18eSTAR, со подолги димензии 125mm и најдобро 250mm покажа многу добра сепарациона моќ, селективност и стабилност. Овие методи можат лесно да се редицајираат во ситуации на недоволна селективност и резолуција со ремоделирање на времетраењето на сепарацијата и максимизирање на бројот на анализи во работниот ден, односно во единица време. Сорбентите од типот на Purospher STAR само ја потврдија нивната стабилност и применливост во екстремни работни услови од аспект на рН и температура, поткрепени со нивните најниски цени на набавка за ваков тип на хроматографски матрикси. Еден од најбитните атрибути на овие колони е постигнувањето на перфектни симетрии на пикот на Азитромицин на хроматограмите, како резултат на високо прочистената силикатна подлога и добрата финална доработка на слободните силанолни групи.

РЕФЕРЕНЦИ

1. USP33
2. BP2011
3. EP7

TRIMETAZIDINE HPLC METHOD OPTIMIZATION – INFLUENCE OF SOLUBILITY PRESCRIBED MEDIUM ON THE SELECTION OF ORGANIC MODIFIER ON MOBILE PHASE COMPOSITION

M.Piponski, M.Globocki, I.Mitreski, E.Lazarevska, M.Petreska, K.Andonovska, G.Trendovska.-Serafimovska

Pharmaceutical Company Replekfarm – Replek, Quality Control Department, Skopje

INTRODUCTION

Creation of quantitative HPLC method for Trimetazidine was governed by composition of medium for solubility testing of the solid pharmaceutical dosage forms composed of 50mM phosphate buffer at pH=6.8. This was the prescribed medium for optimal solubility which we had to obey, and parameter which restricted the use of acetonitrile in development of simple, reproductive and rugged method with less surprises in retention time instabilities and better peak symmetry.

AIM OF WORK

Testing of the two most common organic solvents for mobile phase in HPLC, methanol and acetonitrile in combination with phosphate buffers with different concentrations, pH values and presence or absence of UV-transmittable amino-modifiers, in aim to create simple, suitable accurate, reproductive and rugged method for quantification of Trimetazidine. The peak symmetry and mobile phase simplicity were of prime interest and targets in chromatographic solvent composition conception.

METHODS AND INSTRUMENTS

All testing's were performed with Varian HPLC systems, modular conception Prostar and integrated model 920 with DAD, controlled with Galaxy software Version 1.9. The operating conditions were UV-monitor at 215nm, at 30°C, with 1.1ml/min and 10ul injection volumes. The HPLC column used was LiChrosphere RP Select B 60, with 125 x 4 mm and 5um particles. All used chemicals and reagents were PhEur grade, products of Merck and Sigma.

RESULTS AND CONCLUSION

Since the relatively high concentration of prescribed medium for solubility testing, composed of 50mM phosphate buffer with pH=6.8, using of acetonitrile up to 30mM at pH between 2.8-3.2 region in mobile phase generated relatively asymmetric chromatogram peaks varying at As USP values diapason 1.56-1.82. Using of suitable amino-modifiers with higher UV-transparency corrects the peak symmetry at concentration levels higher than 0.1% v/v. But even the best UV-transparent amino-modifier at concentration levels higher than 0.1% v/v during signal measuring at 215nm can easily disturb baseline flatness. The second problem which appears after many injections is retention time fluctuations and increasing peak asymmetry, the problems induced from great differences in compositions of mobile phase buffer and buffer in solubility medium, their concentration and pH value's. The mobile phase 15mM phosphate buffer with nominal

pH=2.8, cannot keep the chromatographic equilibrium with the more powerful 50mM phosphate buffer with pH=6.8. Increasing the concentration of buffer over 50mM in mobile phase is not very healthy for columns and HPLC systems. Raising the pH of mobile phase buffer up to 6.8, stabilise the retentions but slightly improves the peak symmetry about AsUSP=1.56. Reducing the injection volume to 5ul and further to 3ul with the use of nominal pH of mobile phase buffer solves both problems with retention fluctuations and peak symmetry, but impairs the sensitivity, accuracy and precision of the method. Replacement of acetonitrile in mobile phase with methanol, showed to be much better choice for peak symmetry, retention fluctuations, lower demands of amino-modifiers, and at the end, less toxic exposure of analyst and environment to harmful chemicals.

REFERENCES

- 1.EP7;
- 2.Clarkes Drug Isolation and Characterisation of Drugs

ТРИМЕТАЗИДИН ОПТИМИЗАЦИЈА НА HPLC МЕТОД – ВЛИЈАНИЕ НА ПРЕДОДРЕДЕН ДИЛУЦИОНЕН МЕДИУМ НА СЕЛЕКЦИЈАТА НА ОРГАНСКИ МОДИФИКАТОР ВО СОСТАВОТ НА МОБИЛНАТА ФАЗА

М. Пипонски, М. Глобочки, И. Митрески, Е. Лазаревска, М. Петреска, Г. Трендовска-Серафимовска

Фармацевтска Компанија Реплекфарм – Реплек, Сектор Контрола на Квалитет, Скопје, Р. Македонија

ВОВЕД

Креирањето на квантитативен HPLC метод за Триметазидин беше лимитирано од составот на дисолуциониот медиум при тестирањето на растворливоста на овој фармацевтски препарат во цврста дозжна форма, кој беше фиксиран на оптимален 50 mM фосфатен пуфер со pH=6.8. Вака прескрибираниот оптимален дисолуционен медиум беше ограничување за кое беше неопходно да биде испочитуван, а претставуваше параметар кој ја отежнуваше можноста на користење на ацетонитрилот во развојот на едноставен HPLC метод, со посакувана точност, сензитивност, репродукцибилност и ригидност, со помала веројатност на изненадувачки флукуации на ретенциите и стабилна симетрија на пикот на Триметазидин и базна линија.

ЦЕЛ НА ТРУДОТ

Главна замисла беше да се тестираат двата највообичаени органски солвенти во составите на мобилните фази за RP-HPLC, метанолот и ацетонитрилот, во комбинации со фосфатен пуфер со различна концентрација и pH, присуство и отсуство на UV-транспарентни амини, со цел да се направи едноставен, подобен, точен, репродуктивен и ригиден метод за одредување на Триметазидинот. Симетријата на хроматографскиот пик и едноставноста на мобилната фаза беа од примарно значење и цел во

концептуализацијата на мобилната фаза за HPLC.

МЕТОД И ИНСТРУМЕНТИ

Сите тестирања беа изведувани со Varian-ови HPLC системи, модуларен тип Pro-Star и интегриран модел 920 со DAD, контролирани од софтвер Galaxy верзија 1.9. Оперативни услови беа мониторирање на UV сигнал на 215 nm на 30°C при 1.1 ml/min и 10 μ l инјекционен волумен. Користена беше Merck-ова колона RP Select B 125 x 4 mm со 5 μ m. Сите користени хемикалии беа со PhEur чистота набавени од Merck и Sigma.

РЕЗУЛТАТИ И ЗАКЛУЧОК

Поради релативно високата концентрација на прескрибирањето дисолуционен тест медиум со 50 mM фосфатен пуфер со pH=6.8, користењето на ацетонитрил во мобилната фаза дури и при 30 mM пуфер со pH 2.8-3.2 регионот генерираше реалтивно асиметричен пик со AsUSP=1.56-1.82. Користењето на погодни аминоксидификатори со висока UV транспарентност прави добра корекција на симетријата на пикот со AsUSP под 1.5, но во концентрациите присутни над 0.1% v/v. Повисоките концентрации дури и на најдобрите амини се манифестираат позитивно на обликот на пикот, но негативно на стабилноста на базната линија особено на сигнал на 215 nm на кој се мери Триметазидинот. Втор проблем кој се појавува се флукуациите на ретенциите по неколку инјектирања и порастот на асиметричноста, проблем индуциран од големите разлики во концентрациите и pH на дисолуциониот тест медиум и пуферот на мобилната фаза со што се пореметува еквилибриумот на хроматографската анализа. Мобилната фаза од 15mM-30mM фосфатен пуфер со pH рангирање 2.8-3.2 не е во можност да го одржи константен еквилибриумот на прилично побазен и 2-3 пати поконцентриран пуфер. Покачувањето на концентрацијата на пуферот на мобилната фаза над 50 mM не е препорачливо за долг живот на RP колоните и HPLC пумпите. Дотерувањето на pH на мобилниот пуфер на pH 6.8 го решава проблемот со ретенционите флукуации, но не и со намалување на асиметријата AsUSP под 1.5. Намалувањето на инјекциониот волумен до 5 μ l и посебно до 3 μ l со користење на номиналниот 25mM фосфатен пуфер со pH=2.8 ги решава двата проблеми со обликот на пикот и ретенционите флукуации, но ја намалува сензитивноста точноста и прецизноста на методта. Замената на ацетонитрил со метанол во мобилната фаза покажа дека е многу подобар избор за симетрија на пикот, стабилност на ретенциите, потреба од помали концентрации на амини и сумарно помала токсиколошка експонираност на персоналот и околината.

ЛИТЕРАТУРА

- 1.EP7;
- 2.Clarkes Drug Isolation and Characterisation of Drugs

NEW BYLAW ON VARIATIONS OF MARKETING AUTHORIZATIONS FOR MEDICINAL PRODUCTS IN THE REPUBLIC OF MACEDONIA, HARMONIZATION WITH THE LATEST EU REGULATION

Vesna Nasteska-Nedanovska, Ilcho Zahariev, Marija Trajchuleski, Rajna Kostoska

Bureau for Medicinal Products at the Ministry of Health of the Republic of Macedonia

The Bylaw on variations of marketing authorizations for medicinal products ("Official Gazette of the Republic of Macedonia" No. 145/08) regulates the main principles for classification of the variations, the conditions that have to be fulfilled, the legal procedures for notification or approval of the changes of marketing authorization, as well as the manner of their implementation. This Bylaw was adopted as a result of the process of harmonization of the national regulation in that time in accordance with existing European "soft" legislation.

The implementation of this Bylaw so far showed the need for further amendment, respectively - changing the existing classification of the variations, parallel with the legal procedures, all in goal to improve the procedures and for continuous supervision of the medicinal products. The objective of the new Bylaw on variations of marketing authorizations for medicinal products in the Republic of Macedonia is to improve some particular solutions for the classification of variations and the manner of their notification or approval and implementation of given variation. This review arises from the continuous following the European Commission regulations and transposing them accordingly. The new Bylaw on variations proposes simplified, clear and more flexible legal framework that guarantees the same level of public health care protection. The adjusted procedures laid down in the Bylaw are adapted without departing from the general principles on which those procedures are based. The variations are classified in different categories, depending on the level of risk to public health and the impact on the quality, safety and efficacy of the medicinal product concerned. Definitions for each of those categories and details of the conditions for classification of the various categories of variations are regularly updated in the Bylaw; they assist foresight and follow the basic guidelines with the details for various categories of variations that are integral parts of the Regulation (EC) No. 1234/08 of the Commission of the European Parliament and Council. Certain changes which have the highest potential impact on the quality, safety or efficiency of medicinal products require a complete scientific assessment, in the same way as for the evaluation of the new marketing authorisation applications.

In order to further reduce the overall number of procedures for variations and to enable focusing on those variations that have a genuine impact on the quality, safety and efficiency of the medicinal products, a system of annual reporting for certain minor variations has been introduced. Procedure "do and tell" is set-out for such minor variations that do not require any prior approval before implementation and they need to be notified within 12 months following their implementation. Other types of minor variations whose immediate reporting is necessary for the continuous supervision of the medicinal product are not subject of the annual reporting system.

Each variation requires a separate single submission. In order to facilitate the review of the variations and reduce the administrative bur-

den, grouping the variations is allowed in certain cases, accordingly to the directions provided. Single submission with grouping of variations covers all such variations that fall within one of the allowed cases or have agreement with authority to be in the same procedure.

Grouping of variations can be accepted only in cases when the same group of minor changes are affected in the same time in one or more medicinal products of the same marketing authorisation holder and in cases when multiple variations are introduced within one medicinal product at the same time according to determined directions or after prior consent by the Agency that all stated variations can be included in a single procedure.

The new Bylaw explains when the holder of marketing authorization is allowed to implement the given variation and from an economic aspect it is of essential importance for each producer.

The aim of the new Bylaw on variations is to unify the classification of the variations, to provide continuous supervision of the medicinal product, to adjust the legal procedures and to define their time duration, to clarify when the holder of marketing authorisation has been allowed to implement the variations and to achieve maximum level of harmonization with the latest EU regulation.

The different categories of variations introduced by this Bylaw should be regularly updated in the light of scientific and technical progress, taking into account the particular importance of the harmonization on international level.

REFERENCES

- Bylaw on variations to a marketing authorization for a medicinal product or to the approved documentation of a medicinal product with a marketing authorization („Official Gazette of the Republic of Macedonia” No.62/11 since 05 May 2011)
- Commission Regulation (EC) No 1234/2008 of 24 November 2008 concerning the examination of variations to the terms of marketing authorization for medicinal products for human use and veterinary medicinal products
- Post-authorization procedural advice on variation regulation (EC) No 1234/2008, Human Medicinal Products
- Commission – Guideline on the details of various categories of variations to the terms of marketing authorization for medicinal products for human use and veterinary medicinal products

НОВА РЕГУЛАТИВА ЗА ВАРИЈАЦИИ НА ОДОБРЕНИЕ ЗА СТАВАЊЕ НА ЛЕК ВО ПРОМЕТ ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА, ХАРМОНИЗАЦИЈА СО ЕУ

Весна Настеска-Недановска, Илчо Захаријев,
Марија Трајчулески, Рајна Костоска

*Биро за лекови при Министерство за здравство
на Република Македонија*

Во Правилникот за варијации на веќе добиено одобрение за ставање на лек во промет („Службен весник на Република Македонија”, бр. 145/08) содржани се основните насоки за класификација на варијациите, условите што треба да бидат исполнети, легалните постапки што се водат за пријавување/одобрување на промените, како и за начинот на нивното воведување. Донесувањето на овој правилник произлегуваше од усогласување на оваа материја со Европското „soft” законодавство. Досегашната примена на овој правилник покажа дека има потреба од натамошно доградување, односно менување на постојната класификација на варијациите, но истовремено и на легалните постапки, заради подобрување на квалитетот на истите и подобро следење на лекот. Новиот правилник за варијации во Република Македонија е во функција на подобрување на одделни решенија во класификацијата на варијациите и начинот на нивното пријавување и воведување, а кои произлегуваат од континуираното следење на регулативите на Европската комисија и нивно соодветно транспонирање.

Со новиот правилник за варијации се предлагаат едноставни, јасни и повеќе флексибилни легални решенија што гарантираат ист степен на здравствена заштита кај луѓето. Постапките за пријавување на варијациите се прилагодени без да се отстапи од генералните принципи на кои тие се базираат. Варијациите се класифицирани во различни категории во зависност од ризикот по здравјето на луѓето и нивното потенцијално влијание на квалитетот, безбедноста и ефикасноста на лекот. Насоките и условите за класификација на варијациите се регулаторно ажурирани, ја потпомагаат предвидливоста и ги следат основните напатствија со подробностите за различните категории на варијации што се составен дел на Регулативата (ЕЗ) бр. 1234/08 на Комисијата на Европскиот парламент и Совет. Секако дека одредени промени кои што имаат најголемо потенцијално влијание на квалитетот, безбедноста и ефикасноста на лекот и бараат целосна научна проценка, добиваат ист начин на евалуација како и ново барање за маркетинг авторизација.

Со цел да се намали преобемниот број на постапки за варијации и да се постигне фокусирање на оние варијации кои што имаат значително влијание на квалитетот, безбедноста и ефикасноста на лекот, прифатен е систем на годишно известување за одредени мали промени. За мали варијации кои што не бараат претходно одобрување се воведува постапа „do and tell”, и истите се поднесуваат во рок од 12 месеци после нивното воведување. Одредени мали промени треба веднаш да се нотифицираат после нивното воведување, со цел да се обезбеди континуирано следење на лекот и тие не се предмет на годишно известување (immediate notification). Во една постапка може да се поднесе поединечно барање за секоја одделна варијација. За да се постигне прегледност на варијациите, а со цел да се намали административниот товар, создадена е основа

за групирање на варијациите на еден образец на барање што е дозволено само во одредени случаи, според дадени насоки.

Групирање на варијациите може да се прифати само во случаи кога иста група на мали промени се воведуваат во исто време кај еден или повеќе лекови на еден ист носител на одобријата за ставање во промет и во случаи кога повеќе варијации се воведуваат кај еден лек во исто време според утврдени насоки или по претходна согласност на Агенцијата дека сите наведени варијации можат да се вклучат во една иста постапка.

Правилникот објаснува кога на носителот на одобрението му е допуштено да ја воведат дадената варија, а тоа е од суштинска важност за секој производител од економски аспект.

Целта што треба да се постигне со новиот правилник за варијации е унифицирање на класификацијата на варијациите, обезбедување на континуирано следење на лекот, усогласување на легалните постапки и уредување на роковите за истите, воведување на варијациите и максимална хармонизација со регулативата на ЕУ. Различните категории на варијации што се воведени со овој правилник треба и во иднина редовно да се ажурираат во согласност со научниот и техничкиот развој, земајќи го посебно значењето на интернационалната хармонизација.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

Правилник за варијации на одобрението за ставање на лек во промет или на прифатената документација на лек што има добиено одобрение за ставање во промет („Службен Весник на РМ“ бр.62/11 од 05 мај 2011 година)
Commission Regulation (EC) No 1234/2008 of 24 November 2008 concerning the examination of variations to the terms of marketing authorization for medicinal products for human use and veterinary medicinal products
Post-authorization procedural advice on variation regulation (EC) No 1234/2008, Human Medicinal Products
Commission – Guideline on the details of various categories of variations to the terms of marketing authorization for medicinal products for human use and veterinary medicinal products

CLASSIFICATION OF MEDICINES AS REGARDS THEIR SUPPLY, PREREQUISIT FOR PUBLIC HEALTH PROTECTION

Merjem Hadjihamza

Ministry of Health, Republic of Macedonia

Classification of medicines as regards their supply is the competency of Health authorities of each country and is of particular importance for the preservation of public health. We live in times when enormous financial resources are invested in pharmaceutical industry, which means development of new medicines that represent advancement in pharmacotherapy, thus proper selection and classification of these medicines is of strategic importance for each country especially for those in transition. Legal classification of medicines as regards their supply with or without medical prescription has implications on patient safety, the accessibility of medicines to patients and also at the responsible management of health care expenditure.

Considering the broader accessibility of medicines and the necessity of introducing harmonized provisions and conditions favoring the safe use of prescription and nonprescription medicines, On April 2007 Committee of ministers, member states of the Partial Agreement in Social and Public Health Field, adopted the Resolution ResAP(2007)1

on Classification of Medicines as regards their supply.

Council of Europe Committee of Ministers Resolution ResAP (2007)1 on the classification of medicines as regards their supply

» Recommends to the governments of the member states of the Partial Agreement in the

Social and Public Health Field that they supply information on the national legal classification of medicines as regards their supply on a regular basis;

» Recommends to the same governments that they apply the general provisions and the

Classification of active substances depending on the supply conditions of the medicines which contain them, as set out in the appendices of the Resolution ResAP(2007)1

» Recommends to the same governments that they adopt the general provisions relating to

Minimum information to be included in prescriptions;

These recommendations are not legally binding but they are legal instruments and contain a political statement.

There is a Committee of Experts on classification of medicines as regards their supply which is coordinated by the European Directorate for Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), Council of Europe. This Committee at its work uses scientific approaches and methods taking account of medicines' pharmacological properties, issues relating to direct and indirect risks (pharmacovigilance) as well as miss/abuse, matters of public health concern. It gives annual recommendations on classification of medicines as regards their supply which can be found at the web site of EDQM. Although this recommendations are not legally binding they may be used as a relevant reference to the member states and broader.

It is evident that classification practices differ from Country to Country and harmonization in this field would be preferred especially for over the counter medicines.

Having in mind all above mentioned it may be concluded that the current regulative (Law on medicines and medical devices -article 13 and the Rulebook on the manner of prescribing and dispensing medicinal products on prescription) regarding classification of medicines in Republic of Macedonia do comply with European Directives. The Rulebook allow us to also implement the recommendations and provisions set up at the appendices of Resolution ResAP(2007)1 on the classification of medicines as regards their supply.

REFERENCES

1. Resolution ResAP(2007)1 on the classification of medicines as regards their supply
2. Law on medicinal products and medical devices (www.reglek.com.mk)
3. Rulebook on the manner of prescribing and dispensing medicinal products on prescription (<http://www.reglek.com.mk>)

КЛАСИФИКАЦИЈАТА НА ЛЕКОВИТЕ СПОРЕД НАЧИНОТ НА ИЗДАВАЊЕ ПРЕДУСЛОВ ЗА ЗАЧУВУВАЊЕ НА ЈАВНОТО ЗДРАВЈЕ

Мерјем Хаџихамза

Министерство за Здравство, Република Македонија

Класификацијата на лековите според начинот на издавање претставува обврска на здравствените авторитети односно на националните тела во рамките на здравствениот систем на секоја земја и е од особена важност за зачувување на јавното здравје. Живееме во време кога енормни финасиски средства се инвестираат во фармацевтската индустрија што резултира со производство на се поголем број нови лекови кои претставуваат унапредување во фармакотерапијата но сепак за секоја земја а посебно за земјите во транзиција исклучително важно и од стратешко значење е правилната селекција на тие лекови и соодветниот начин на пропишување и издавање. Издавањето на лековите на лекарски рецепт или без рецепт има импликации не само врз безбедноста на пациентот и достапноста до лековите туку и на одговорното управување со здравствените трошоци. Поаѓајќи од аспект на безбедноста на пациентите, достапноста до лековите како и зачувувањето на јавното здравје и Советот на Европа односно неговите тела одговорни за фармацевтската грижа се заинтересирани за хармонизација на националните законски одредби поврзани со класификацијата на лековите според начинот на издавање. Токму од овие причини Министерскиот комитет на земјите членки на Парцијалниот договор на полето на социјалното и јавното здравје во април 2007 година ја усвои Резолуцијата ResAP (2007)1 за класификација на лекови според начинот на издавање. При тоа на владите на земјите членки, потписнички на Парцијалниот договор во областа на социјалното и јавното здравје согласно Резолуцијата се дадени препораки кои се однесуваат на:

- » доставување на податоци за: класификацијата на лековите според начинот на издавање на редовна основа
- » применување на општите критериуми за класификација на лековите според начинот на издавање како што тоа е утврдено во апендиксите кои произлегуваат од резолуцијата ResAP (2007)1 како и
- » прифаќање на општите критериуми за минимумот информации што треба да ги содржи еден рецепт

Препораките кои произлегуваат од Резолуцијата не претставуваат законска обврска но сепак се легални инструменти кои во себе содржат и политичка порака.

Во рамките на Советот на Европа постои Комисија за класификација на лекови според начинот на издавање и истата работи под водство на Европскиот Директорат за Квалитет на лекови (EDQM) во Стразбур. Во својата работа оваа комисија користи научни пристапи и методи имајќи ги при тоа во предвид фармаколошките особини на лекот, прашањата за директните и индиректните ризици (фармаковигиланцата), злоупотребата на лековите како и други прашања од значење за јавното здравје. Оваа Комисија своите препораки по однос на класификацијата на лековите според начинот на издавање ги дава на годишно ниво и истите се објавуваат на веб страната на EDQM. Иако овие препораки не се правно обврзувачки во секој случај претставуваат добар основ за референца при постапките на класификација на лековите според начинот на издавање за било

која земја од Европската Унија и пошироко. Имајќи го во предвид горенаведеното може да се заклучи дека сегашната регулатива во Република Македонија (член 13 од Законот за лекови и медицински помагала како и Правилникот за начинот на пропишување и издавање на лекови на рецепт) во однос на класификацијата на лековите според начинот на издавање е во согласност со Европската регулатива. Донесениот Правилник кој произлегува од Законот за лекови истотака ни дава можност да ги имплементираме препораките како и критериумите востановени во апендиксите на Резолуцијата ResAP(2007)1 за класификацијата на лековите според начинот на издавање. Како и да е евидентно е дека на глобално ниво класификационите практики се разликуваат од земја до земја и во полза на зачувување на јавното здравје хармонизација на ова поле би била пожелна, посебно кога се работи за лековите кои можат да се издадат и без лекарски рецепт (ОТЦ-лековите).

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. Resolution ResAP(2007)1 on the classification of medicines as regards their supply
2. Закон за лекови и медицински помагала (<http://www.reglek.com.mk>)
3. Правилник за начинот на пропишување и издавање на лекови на рецепт (<http://www.reglek.com.mk>)

HPLC DETERMINATION OF KETOPROFEN RESIDUES ON MANUFACTURING EQUIPMENT SURFACES IN CLEANING VALIDATION PROCESS

Katerina Kocova, Irina Batkovska Borozanova, Despina Efremova, Gordana Trendovska Serafimovska

Quality Control Department, Pharmaceutical Company "Replekfarm", DOOEL, Kozle 188, Skopje, Republic of Macedonia

INTRODUCTION

In the pharmaceutical industry, cleaning validation is an essential part of the production of drugs and active pharmaceutical ingredients. Cleaning validation is a process of providing documented evidence that the cleaning methods used for the equipment in the manufacture of pharmaceutical products, consistently controls potential carryover of a product into a subsequent product to a level which is below predetermined level of acceptability.

In many cases the same equipment is used for manufacturing of different pharmaceutical products. Well defined cleaning procedure must be used to avoid any contamination of a subsequent product with residues of a previous product, detergents and microbial contaminants.

MATERIAL AND METHODS

Varian HPLC System was used, equipped with Varian Prostar 240 pump, Varian 325 LC detector and Galaxie1.9.301.220 software for data handling.

The experiments were carried out by RP- HPLC using LiChrospher[®] RP 18, (125 x 4 mm i.d.) column. The HPLC system was operated at isocratic mode using mobile phase composed of solvent A (20mM KH₂PO₄, pH-3.5) and acetonitril as solvent B - in ratio 50% : 50%. The temperature was 35°C and UV detection was at 254 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

The goal of this study is to develop a sensitive HPLC method for determining the residues of Ketoprofen on the surfaces equipment, used in manufacturing process, thus controlling the cleaning methods. The Pharmacopoeia HPLC method was appropriately adapted and validated according to ICH guidelines. The method was validated through determining these validation characteristics: selectivity, linearity, precision, accuracy, quantification limit and detection limit. Achieved values for LOD of 0,05 µg/ml and for LOQ of 0,2 µg/ml, indicate that the proposed HPLC method is enough sensitive for determining the established product residual limits. Predetermined levels of acceptability for Ketoprofen residues were in the range from 4.9 ppm to 6.5 ppm, depends on the used manufacture equipment.

The recovery and its RSD are very important parameters used to evaluate the effectiveness and credibility of the cleaning process. The direct surface sampling method (swab method) was used. It was defined the percentage of swab recovery process using the coupons that mimic the surface equipment. The obtained % recovery of 85.51 confirmed the appropriateness of the cleaning method.

CONCLUSION

In conclusion, the developed HPLC method for determination of residues of Ketoprofen on manufacturing equipment surface is enough sensitive and can be used in routine analyses in cleaning validation process.

REFERENCES

1. Cleaning Validation Manual, Syed Imtiaz Haider, Ph.D., Erfan Syed Asif Ph.D., 2010, USA
2. FDA, Guide to Inspections of Validation of Cleaning Processes, (Validation of cleaning Processes 7/93).
3. Anex 15 GMP, 2001;

ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КЕТОПРОФЕН РЕЗИДУИ ОД ПОВРШНИ НА ПРОИЗВОДНА ОПРЕМА СО HPLC МЕТОД ВО ПРОЦЕС НА ВАЛИДАЦИЈА НА ЧИСТЕЊЕ

Катерина Кочова, И. Батковска Борозанова, Д.
Ефремова, Г. Трендовска Серафимовска

Сектор Контрола на квалитет, Реплекфарм ДООЕЛ, ул.Козле 188,
Скопје, Р.Македонија

ВОВЕД

Во фармацевтската индустрија валидација на чистење претставува важен сегмент во производство на лекови и активни супстанции. Под валидација на чистење се подразбира процес кој ќе обезбеди со соодветна постапка на чистење на производната опрема, да се отстранат остатоците на активни компоненти под утврдените лимити на прифатливост.

Во многу случаи, истата производна опрема може да се користи за производство на различни производи. За да се избегне контаминација на нареден производ (од претходен производ, детергенти, микроорганизми) неопходна е адекватна постапка на чистење.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

При квантификацијата се користи HPLC систем Varian, опремен со терциерна пумпа, UV-VIS детектор, автосемплер, термостат за колона контролиран преку софтверски програм Galaxy Data system. Користена е колона LiChrospher[®] RP 18(125 x 4 mm i.d.). Применет е изократски начин на хроматографирање со мобилна фаза составена од растворувач А (20mM KH₂PO₄, pH-3.5) и растворувач Б - ацетонитрил во однос 50% :50%. Употребена е температура од 35°C и детекција од 254 nm.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Целта на оваа студија е да се развие сензитивен HPLC метод за определување на резидуи од Кетопрофен на површина од производна опрема, за да се контролира процесот на валидација на чистење. Фармакопејскиот HPLC метод за определување на Кетопрофен EP, беше соодветно адаптиран и валидиран во однос на селективност, линеарност, прецизност/точност како и сензитивност при што беа определени лимитот на детекција -LOD и лимитот на квантификација -LOQ. Добиените вредности за LOD од 0,05 µg/ml и 0,2 µg/ml за LOQ, укажуваат дека предложениот HPLC метод е доволно осетлив за да ги детерминира утврдените лимити на прифатливост на резидуи од Кетопрофен. Лимити на прифатливост за резидуи на Кетопрофен се од 4,9 ppm до 6,5 ppm, во зависност од користената производна опрема.


Постапката на земање на брис од поедини делови на производната опрема, беше претходно утврдена преку определување на аналитичкиот принос "Swab Recovery" на спајкувани иноксни плочи- купони (на три концентрациски нивоа по две свобувања на секое ниво) чиј материјал соодветствува на производната опрема. Техниката на земање на брисеви беше оптимизирана, со цел да се добие прифатлив аналитички принос на Кетопрофен од спајкуваните челични површини. Просечниот аналитички принос од 85,5% укажува дека применатиот начин на земање на брисеви е соодветен за студијата на валидација на чистење.

ЗАКЛУЧОК

Употребениот HPLC метод е доволно сензитивен и може да се користи во рутинска анализа како дел од процесот на валидација на чистење.

ЛИТЕРАТУРА

- Cleaning Validation Manual, Syed Imtiaz Haider, Ph.D., Erfan Syed Asif Ph.D., 2010, USA
FDA, Guide to Inspections of Validation of Cleaning Processes, (Validation of cleaning Processes 7/93).
Anex 15 GMP, 2001;



**ФАРМАКОЕКОНОМИЈА /
СОЦИЈАЛНА ФАРМАЦИЈА /
ФАРМАКОИНФОРМАТИКА**

орални презентации

**PHARMACOECONOMY /
SOCIAL PHARMACY /
PHARMACOINFORMATICS**

oral presentations

HEALTH ECONOMIC ASPECTS OF DIABETES

Marcin Czech

¹Department of Pharmacoeconomics, Medical University of Warsaw
²Europe East Regional Office, Novo Nordisk

Diabetes mellitus is one of the most important clinical problems in the world today being the 4th leading cause of death in Europe. According to information from the World Health Organization (WHO) more than 180 million people worldwide have diabetes. In 2005, an estimated 1.1 million people died from diabetes. Almost half of diabetes deaths occur in people under the age of 70 years and 55% are in women. Without introducing effective projects within the public health domain, diabetes-related deaths will increase by more than 50% in the next 10 years.

More than 32 million European Union (EU) citizens have diabetes, meaning 9% of the total population.

An additional 32 million citizens (8,8% of the population) suffer from impaired glucose tolerance (pre-diabetes).

This situation will deteriorate in the future, with an estimated 38,3 million adult citizens with diabetes in 2030.

Type 2 diabetes, accounting for about 85-90% of all diabetes in Europe, decreases life expectancy by 5-10 years.

High prevalence and incidence have a substantial social impact, especially in less developed countries like those of Central and Eastern Europe.

Health economic aspects of diabetes can be considered from at least three stand points; global burden of the disease, cost-effectiveness of different interventions and cost-utility, where quality of life aspects play their role.

Costs of illness include not only costs associated with prevention, diagnosis, and treatment (direct costs) but also indirect costs regarding reduced or lost productivity.

In most EU Member States, diabetes is responsible for over 10% of healthcare expenditure; a figure sometimes climbing as high as 18,5%. In total, diabetes costs the EU at least 77 billion EUR a year.

The general healthcare cost for an EU citizen with diabetes is on average 2.100 EUR a year.

Despite strong beliefs, it is not the treatment of diabetes that costs the most; it is the treatment of its complications. A vast majority of diabetic patients remain uncontrolled, which increases costs of micro- and macro-angiopathic complications (including blindness, neuropathy, diabetic foot, and arteriosclerosis of the coronary and the renal arteries). In other words, the longer one waits for treatment, the more it will cost.

Indeed, 25% of these expenditures are spent on the treatment of diabetes, while 75% is spent on late stage complications; only 7% is spent on anti-diabetic drugs, while 55% is related to hospitalisation.

Cost-effectiveness evaluations provide reliable information supporting a decision making process. It helps pricing and reimbursement specialists from governments to choose best options from clinical and economic point of view. It has a special importance in case of innovative, usually expensive therapies and diagnostic procedures. For this purpose, especially in chronic disease health economic modeling is frequently used. Diabetes is a good example of such a disease. Modeling allows extrapolation of treatment results and costs beyond the clinical study period.

New health technologies have an impact on quality of life evaluation, which is a part of patient-reported outcomes, which is growing in im-

portance in contemporary pharmacoeconomics and outcomes research. These considerations are included in cost-utility analyses, which are obligatory in many jurisdictions including countries of Central and Eastern Europe. This domain is regulated by law, described by detailed pharmacoeconomic guidelines and driven by specific institutions like health technology assessment agencies.

All these efforts, an involvement of different stakeholders are aimed at ensuring the most rational use of scarce resources of health care systems. Special emphasis should be placed on these aspects in the period of global crisis coupled with cost containment measures and in the case of diseases with a strong impact on the society like diabetes mellitus.

TECHNOLOGY ASSESSMENT AND PHARMACOECONOMICS TODAY

Dinko Vitezić

University of Rijeka School of Medicine and University Hospital Centre Rijeka, Rijeka, Croatia

Health technology assessment (HTA) is a new rapidly developing field, accepted internationally as a multidisciplinary process that summarizes information about the medical, social, economic, and ethical issues related to the use of health technology (drugs, medical devices, procedures, etc.) in a systematic, transparent, unbiased and robust manner. The main aim of HTA is to support health policy decisions on different levels. Today, in many of developed and developing countries agencies for HTA have been established on national and also on international level. Part of HTA is health economy and pharmacoeconomics which can be defined as the branch of economics that uses four main types of evaluation (cost-benefit, cost-effectiveness, cost-minimization, and cost-utility analyses) to compare pharmaceutical products and treatment strategies (Table).

Table. Classification of economic evaluations according to the measurement of health gain

<i>Analysis</i>	<i>Measurement of health gain</i>	<i>Measurement of costs</i>	<i>Applicability</i>
<i>cost-minimization</i>	non-specified (equal health gain)	monetary value	equal health gain
<i>cost-effectiveness</i>	natural units (traditional clinical trial endpoints)	monetary value	non-equal health gain measurable in the same health dimension
<i>cost-utility</i>	quality adjusted life years	monetary value	any medical procedures
<i>cost-benefit</i>	monetary value	monetary value	any medical and non-medical procedures and investment options

These evaluations provide healthcare decision-makers with valuable information, allowing optimal allocation of limited resources. When conducting pharmacoeconomic analyses, researchers often struggle with limited local epidemiological and cost data.

The most frequently used analysis is cost-effectiveness analysis (CEA) which is a technique that is most appropriately applied when a choice must be made between two or more competing options for which the expected health gains can be expressed in terms of a common outcome measure. CEA has been described as a technique for making decisions at the margin, in situations where the question may be framed as, "Is it worth spending an additional financial mean (e.g. Euro) to achieve the additional benefits offered by the new drug compared to existing therapy?" It would be complicated and time-consuming to rank all available health care technologies according to their cost-effectiveness, therefore the cost-effectiveness criteria are assessed mainly for the new and expensive therapies in the majority of countries.

The importance of evidence based health policy is widely acknowledged among health care policy-makers all over the world. The transparent method of HTA may improve the consistency of pharmaceutical reimbursement decisions and makes this process in accordance to the Transparency Directive of the European Union. For the adequate usage of HTA process and pharmacoeconomics, health economic training and education of local professionals, including decision-makers, is of utmost importance.

PHARMACOECONOMY AND OUTCOMES RESEARCH: INDUSTRY PERSPECTIVE

Monika Szkultecka-Debek

Roche Poland

Nowadays more and more countries are looking for tools which can be helpful when taking decisions related to spending the budget funds on new technologies. Pharmacoeconomics and outcomes research can be such a tool. It can support decision making process and be one of the integral elements of the reimbursement process. Both activities areas can provide answer to the questions that the decision makers can face, not only about the value of the drugs but also of other health related technologies.

To ensure proper and common understanding it is important for all stakeholders to have guidelines on what is required, how to approach the topic and a transparent decision making criteria should be defined. It is of importance to consider in the process all stakeholders, allowing for open communication with the industry, not forgetting about patients and their preferences as they are those who know the best the disease they have to live with. Such complex approach will allow all involved parties to work and deliver high quality level results.

In some countries with established HTA agencies and where pharmacoeconomics has been already implemented in the reimbursement process, recommendations of HTA agencies are not always implemented. What could be done at the very early stage of pharmacoeconomics implementation to use it in the best and most productive way?

DEVELOPING THE NATIONAL FRAMEWORK FOR GOOD GOVERNANCE IN THE PUBLIC PHARMACEUTICAL SECTOR

Renata Slaveska Raichki¹, Arta Kuli²,
Tatjana Kadifkova Panovska¹ and Merjem Hadjihamza³

¹Faculty of Pharmacy, University Ss. Cyril and Methodius, Skopje, Republic of Macedonia

²WHO Regional Office, Republic of Macedonia,

³Ministry of Health, Republic of Macedonia

Good governance is an essential factor for economic growth and sustainable development at all levels and within all sectors of society. The establishment of a national integrity system is a basic prerequisite for the performance of good governance. An integrity system is based upon a set of elements that ensure and reflect the characteristics of "Good Governance" and comply with established moral values and ethical principles in structuring and implementing policies and enforcing laws (1). In 2004, World Health Organization (WHO) established the Good Governance for Medicines (GGM) programme in line with the WHO Global Medicine Strategy. The programme's goal is to support countries in maintaining efficient pharmaceutical system through the implementation of transparent, accountable administrative procedures, supported by the promotion of ethical practices (2). Our country, recognizing the concept of the GGM as one of the priority of the Medicines Strategy is among the countries which pioneered work related to this issue. With the aim of encouraging and supporting the development and maintenance of a sound health system with high standards, based upon the clearance of the Ministry of Health and in collaboration with WHO regional office, Macedonia joined the GGM project at the end of 2007. The GGM program is implemented in a 3-steps approach. Phase I, "Measuring transparency in the public pharmaceutical sector", provides a comprehensive picture of the level of transparency and the vulnerability to unethical practices in key functions of the pharmaceutical sector (3). The Phase II includes the development of "Ethical Framework for Good Governance in the Pharmaceutical Sector" after wide consultation with key stakeholders. The 3rd phase aims to implement and institutionalize the national GGM programme through a set of officially adopted long-term strategic activities. Recommendations for Good Governance Practices in the pharmaceutical sector suggest building and following two approaches:

» Values approach: 1. A framework of moral values and ethical principles; 2. A code of conduct; 3. A programme for the socialization of an ethical framework and code of conduct; 4. Promotion of moral leadership.

» Disciplinary approach: 1. Established anti-corruption legislation;

2. Mechanisms for whistle-blowing; 3. Sanctions on reprehensible acts based on anticorruption legislation; 4. Established management procedures, including internal and external financial audits; 5. Collaboration between anti-corruption agencies, NGOs and private sector; 6. Management, coordination and evaluation of the integrity system.

Development of a national framework for Good Governance in the pharmaceutical sector requires consensus building through the discipline approach ("top to bottom") which is based on the development and review anti-corruption laws, policies, by-laws and administrative procedures. Values approach ("from bottom to top") starts inside institutions based on consensus building on shared moral values and ethical principles and standards.

Based on WHO model framework document (4) and its contextualization to Macedonian context, Ethical framework defines the elements that need to be in place at country level including; moral values and ethical principles necessary for the building of Good Governance in the pharmaceutical sector. In addition, the document includes the code of conduct in order to establish ethical standards, norms and basic principles of public service ethics, values and high professional standards for public servants, and to enhance adherence to these standards and values and consolidate the foundations of good practices and good governance.

The GGM Project is motivating in terms of its overall strategic and broad impact. It has a clear dimension of upgrading the capacity and capability (strengthened competitiveness of human potential, substantial improvement of drug management, new services and applications that are tailored to specific needs). Thereby it has a potential to make an essential contribution to the pharmaceutical functions, societal issues, health policy and the health system in the country.

REFERENCES

1. National integrity system: a guiding framework. Kuala Lumpur, Integrity Institute of Malaysia and United Nations Development Programme, 2007 (<http://iim.com.my>).
2. Measuring Transparency in Medicines Registration, Selection and Procurement. Geneva, WHO, 2006
3. Report on "Measuring Transparency in Medicines Registration, Promotion, Inspection, Selection, Procurement and Distribution in the former Yugoslav Republic of Macedonia", National Assessment, WHO, 2009
4. Eloy Anello, A framework for good governance in the pharmaceutical sector, Department of Essential Medicines and Pharmaceutical Policies, Geneva, WHO, 2008

РАЗВОЈ НА НАЦИОНАЛНА РАМКА ЗА ДОБРО УПРАВУВАЊЕ ВО ЈАВНИОТ ФАРМАЦЕВТСКИ СЕКТОР

Рената Славеска Раички¹, Арта Кули², Татјана
Кадифкова Пановска¹ и Мерјем Хаџихамза³

¹Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје,
Република Македонија

²СЗО Регионална канцеларија, Република Македонија,

³Министерство за здравство, Република Македонија

"

Добро управување е неопходен фактор за економски раст и одржлив развој на сите нивоа и во сите сектори на едно општество. Воспоставување на национален систем на интегритет претставува основен предуслов за исполнување на "Добро управување". Системот за интегритет е втемелен на серија елементи кои што ги обезбедуваат и одражуваат карактеристиките на "Добро управување" и се во согласност со востановените морални вредности и етички принципи во обликување и примена на политики и спроведување закони (1). Во линија со глобалната стратегија за лекови, во 2004 година, Светската здравствена организација (СЗО-ВНО) ја воведува програмата "Добро управување со лекови" (GGM). Програмската цел е да се обезбеди поддршка на земјите во одржување на ефикасен фармацевтски систем со имплементација на транспарентни, отчетни административни процедури поткрепени со промоција на етички практики (2). Нашата земја, распознавајќи го концептот на GGM како еден од приоритетите во стратегијата за лековите, е меѓу земјите предводници кои што се посветија на ова прашање. Со цел да се поттикни и поддржи развој и одржување на здравствен систем со високи стандарди, Македонија се придружи на GGM проектот, кон карајот на 2007 година, врз основа на одобрение од страна на Министерството за здравство и во соработка со СЗО Регионалната канцеларија.

GGM програмата се спроведува како процес во три фази. Првата фаза е посветена на "Проценка на транспарентност во јавниот фармацевтски сектор", со што се обезбедува детална слика за нивото на транспарентност и ранливост од неетички практики во клучните функции на секторот (3). Втората фаза е посветена на развој на "Етичка рамка за добро управување во фармацевтскиот сектор" врз основа на широки консултации со клучните засегнати страни. Целта на третата фаза е да се имплементира и институционализира националната GGM програма со серија на официјално прифатени, долгорочни активности од стратешки карактер. Препораките за "Добри практики во управување со фармацевтскиот сектор" упатуваат на градење и следење на два пристапи:

А. "Пристап на вредности": 1. Рамка на морални вредности и етички принципи; 2. Кодекс на однесување; 3. Програма за социјализација на етичката рамка и кодексот на однесување 4. Промоција на морално лидерство.

Б. "Дисциплински пристап": 1. Воспоставување на анти-корупциска легислатива; 2. Механизми за алармирање; 3. Спроведување санкции и мерки за укор врз основа на антикорупциската легислатива; 4. Воспоставување на постапки за управување кои вклучуваат внатрешни и надворешни финансиски ревизии; 5. Соработка со анти-корупциски агенции, невладини организации и приватниот сектор; 6. Управување, координирање и оценка на системот на интегритет.

Развојот на националната рамка за “Добро управување во фармацевтскиот сектор” бара концензус изграден низ дисциплинскиот пристап (т.н. “од врвот кон основата”), поставен на развој и преглед на анти-корупциските закони, политики, подзаконски акти и административни процедури. Пристапот базиран на вредности, (т.н. “од основата кон врвот”) почнува во институциите врз основа на изградба на концензус за заеднички морални вредности, етички начела и стандарди. Врз основа на WHO моделот за документот на рамката (4) и адаптација на неговата содржина на постоечките услови, етичката рамка ги дефинира елементите кои што треба да се постават на национално ниво а вклучуваат: морални вредности и етички принципи потребни за изградба на “Добро управување” во фармацевтскиот сектор. Дополнително, документот вклучува кодекс на однесување со цел да се постават етички стандарди, начела и основни принципи на етиката за јавните услуги, вредности и високо професионални стандарди за државните службеници. Исто така, се унапредува почитувањето на овие стандарди и вредности со што се консолидираат и темелите за “Добри практики” и “Добро управување”.

GGM проектот е мотивирачки во однос на целокупното стратешко и опсежно влијание. Поседува јасна димензија за надградба на капацитетите и способностите (јакнење и унапредување на конкурентноста на човечкиот потенцијал, значително подобрување на управувањето со лековите, нови услуги и апликации кои се надоврзуваат на специфичните потреби). Врз основа на прикажаното, програмата поседува потенцијал за неопходен придонес на фармацевтските функции, општествените прашања, здравствените политики и здравствениот систем во земјата.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. National integrity system: a guiding framework. Kuala Lumpur, Integrity Institute of Malaysia and United Nations Development Programme, 2007 (<http://iim.com.my>).
2. Measuring Transparency in Medicines Registration, Selection and Procurement. Geneva, WHO, 2006
3. Report on “Measuring Transparency in Medicines Registration, Promotion, Inspection, Selection, Procurement and Distribution in the former Yugoslav Republic of Macedonia”, National Assessment, WHO, 2009
4. Eloy Anello, A framework for good governance in the pharmaceutical sector, Department of Essential Medicines and Pharmaceutical Policies, Geneva, WHO, 2008

COST ANALYSIS OF THE MANAGEMENT OF DIABETES IN ALBANIA

Besiana Bezhani¹, Florian Toti², Adriana Çano³

¹Hygeia Hospital Tirana

²Qendra Spitalore Universitare Nene Tereza

³Poliklinika nr 8, Tirane

OBJECTIVE

Determine the cost per patient and determine the overall cost of illness of diabetes mellitus in Albania by the Ministry of Health, the Insurance Institute of Public Health (ISKSH) and prospects of the society.

METHODS

To do my study, I conducted an observational study, retrospective

using the method of clinical audit, an instrument that through the analysis and review of the work, aims to assess the cost of managing this disease in Albania by Albanian Institutions. Were identified the direct means (drugs, laboratory tests, doctors, hospitals, health care) and the cost has been verified by national lists or values that these institutions have established. The data used for these calculations come from two sources: 1) . From the recordings and by referring to the individual medical records from the database of Dr. Adriana Cano, GP at the clinic no. 8 of Tirana. We extracted (for each diabetic patient-a total of 92) respective data on medications used for for each diagnosis established by specialists, covering the period from January to November 2010 (observation period). 2). In addition, we studied the medical records of discharged patients from the hospital in the department of endocrinology at the University Hospital Center Mother Teresa in Tirana. We decided about the study period to be two months, August and September 2010, to better represent the average number of admissions. The total number of folders is 190.

RESULTS

The cost of a patient admitted to hospital in the department of endocrinology was € 146.54 for an average hospitalization of 7.11 days. Our study calculated only the direct costs. As for indirect costs or social point of view there is no data or studies available. For the patient following the ambulatory service, for 1 patient, the cost of their diabetes treatment is Eur 13.43 per month or 38.6%, while the total treatment with care also for the complications is EUR 34.8 per month. Of this amount, ISKSH pays respectively Eur 12.4 and Eur 29.1 per month and the patient pays the rest. The total amount spent by this Institution for antidiabetics A10-group, is EUR 4,426,344.12 per year.

CONCLUSIONS

We estimated the direct annual cost of diabetes in Albania by the Albanian institutions' point of view. For indirect costs or social point of view there is no data or studies available. We also estimated the direct cost per patient and the cost of treatment of diabetes and macrovascular complications. The economic burden is significant and it is not comparable to results from other countries. The model showed a logical progression of the disease.

REFERENCES

1. World Health Organization. Diabetes mellitus fact sheet no. 312. Geneva: WHO; 2006.
2. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, et al. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 1999;100:1134-46.
3. Wannamethee SG, Shaper AG, Lennon L. Cardiovascular disease incidence and mortality in older men with diabetes and in men with coronary heart disease. *Heart*. 2004;90:1398-403.
4. Ettaro L, Songer TJ, Zhang P, Engelgau MM. Cost-of-illness studies in diabetes mellitus. *Pharmacoeconomics*. 2004;22:149-64.
5. Akobundu E, Ju J, Blatt L, Mullins CD. Costof- illness studies: a review of current methods. *Pharmacoeconomics*. 2006;24:869-90.
6. Oliva J, Lobo F, Molina B, Monereo S. Direct health care costs of diabetic patients in Spain. *Diabetes Care*. 2004;27:2616-21.
7. Taylor AK. Medical expenditures and insurance coverage for people with diabetes: estimates from the National Medical Care Expenditure Survey. *Diabetes Care*. 1987;10:87-94
8. Massi-Benedetti M, CODE-2 Advisory Board. The cost of diabetes type II in Europe, the CODE-2 Study. *Diabetologia*. 2002;45:S1-4.
9. <http://www.isksh.com.al>
10. <http://www.moh.gov.al/>
11. <http://www.instat.gov.al/>
12. <http://www.who.int/>
13. <http://www.diabetesatlas.org/>
14. <http://www.eatlas.idf.org/>
15. <http://www.diabetes.org>
16. <http://www.nlm.nih.gov/>

ADJUSTMENT AND IMPLEMENTATION OF CROATIAN P&R MODEL IN MACEDONIA

Tonci Buble

Belupo d.d., Croatia

Pricing and Reimbursement policy in Croatia was established in 2001, where the final P&R policy model was established in 2006. This model is still in place with some minor changes. In 2009, Croatian model was presented in Macedonia, using the same methodology for referral as Croatian model: external referral as comparative price for all drugs from the positive lists and internal referral as reference price for prescription drugs as per pharmaco-therapeutic groups.

In 2001 in Croatia started implementation of model with external referral of prices and calculation of comparative prices, while reimbursement was defined as percentage of wholesale price. Even though the same methodology is still in place, the system has been through many changes (levels of correction of the prices, rules for prices of new generics) and the major influence on increase of expenditures was the measure of releasing of over 50% of ensures of payment co-payment (2003). Change in P&R policy was placed in 2006 when in reimbursement for drugs on prescription, reference prices per therapeutic groups were introduced, where co-payment in percentages has changed in difference in price towards the reference price and any release for paying co-payment was excluded.

Croatian model for P&R provided unique approach in defining prices for drugs on positive list, financially covered by the National health insurance (HZZO). When system was completely defined and implemented (2007) it was based on external referral to 3+2 countries for reference (Italy, France, Slovenia + Spain, Czech Republic). Three levels of comparison were defined, where comparison was determined separately for generics and for originator drugs. Negotiations for problematic prices of specific drugs were introduced as well. The internal referral system was placed through definition and implementation of 41 therapeutic groups for prescription drugs (drugs with same or similar pharmacotherapeutic effect, mostly up to the fourth ATC level of comparison). Additional criteria for defining the reference price were possibilities for supply of the market (share of consumption), based on expenditures and utilization for previous year. The system enabled authorities in realistic projections of expenditures on drugs on yearly basis, as well as control of the market and rational drug use. This is shown in drugs expenditures for the period 2008-2010 where expenditures for prescription drugs remained the same, despite inclusion of new drugs on the drug list and increased number of prescriptions for approx. 7 millions.

The adjustment of the Croatian P&R system in Macedonia started in 2009 and implementation as of May 2010. The Croatian model was adjusted to the needs of Macedonian's pharmaceuticals market. The same model of external referring was used for 383 drugs from the primary health care positive list, where four countries of reference were selected (Croatia, Slovenia, Serbia and Bulgaria). Internal referring was used for 5 pharmacotherapeutic groups defined for prescription drugs. Within the methodology, data on drug utilization and expenditures for previous year was used. The model enabled decrease of total drug expenditures for the patients (in terms of decreased co-payment) for same expenditures for National health insurance (FZOM). It is shown by the following indicators announced by the FZOM: for more than twice the number of drugs without co-payment has been increased (209

generics without copayment compared to 77 as per old model), and even though the number of prescriptions in 2010 was increased for 2,1%, expenditures for drugs for FZOM decrease 2,8%.

Both models were implemented adequately and their best practice was seen as increasing transparency for drug expenditures and rational drug utilization for National health insurances. Overall overview of the expenditures was established with realistic estimation of planned costs. In addition, model enabled the National insurance to obtain more available effective drugs for the population within same expenditures. Systems were set as benefit for state and patients, but they need "close look" and fine tuning, regarding the needs of the population, countries' financial capacities and developments of pharmaceuticals' markets.

CONSUMPTION OF THE PRESCRIPTION DRUGS COVERED BY THE HEALTH INSURANCE FUND: DRUGS FROM GROUP C, J AND N BY ATC CLASSIFICATION

Kristina Hristova, Sonja Zlatanovska, Kristina To-sevska

Health Insurance Fund of Macedonia

Monitoring of the consumption of drugs has a direct impact on the process of rational consumption of drugs. The costs associated with use of drugs account for a significant portion of the total costs of health care which amounts to approximately 10-15% in more developed countries and around 30 to 40% in some developing countries.

In the recent years the Health Insurance Fund in Macedonia put emphasis on the monitoring and analysis of the consumption of drugs that are covered by the HIF. It is a good way to assess the rational use of drugs, plan the introduction of new drugs on the positive list that is provided by the Fund and plan the primary health care drugs budget.

The HIF receives the data on drug consumption from its own e-information system which directly collects the data from the contracted pharmacies. So far, the HIF concluded contract with 740 pharmacies out of 838 registered in the Republic of Macedonia, that is 88% of all pharmacies.

The purpose of this analysis is to evaluate and present the consumption of drugs in different cities in Macedonia. The classification of drugs is in accordance with ATC classification. The consumption of drugs is followed by the methodology of defined daily doses (DDD). The targeted groups of drugs in accordance to the highest consumption per volume and value of prescriptions are as following: antibiotics (J), drugs for the cardiovascular system (C) and the nervous system (N).

For the period 2008-2010 the largest amounts and growth in the consumption rate, increase from 21 to 25% has been observed in the C drug group. It is followed by the second largest drugs group J (antibiotics) which share remains constant at the level of 20% of the total amount. In the same period, drugs group N is on the third place

with around 15% of the total amount of consumption.

For the same period (2008-2010) the largest volume has been observed for the C drug group with 40% of all prescribed drugs. Drugs from the N group are the second and remark increase of 2% (from 13% to 15%). On the third place are J group drugs with approximately 13% of all prescribed drugs, and remark decrease of 2% (from 15% to 13%).

ПОТРОШУВАЧКА НА ЛЕКОВИ НА РЕЦЕПТ НА ТОВАР НА ФЗОМ: ЛЕКОВИ ОД ГРУПА С, Ј И N СПОРЕД АТС КЛАСИФИКАЦИЈА

Кристина Христова, Соња Златановска, Кристина
Тосевска

Фонд за здравствено осигурување на Македонија

Следењето на потрошувачката на лековите има директно влијание врз процесот на рационална потрошувачка на лековите. Трошоците поврзани со употребата на лековите завземаат значаен дел од вкупните трошоци за здравствена заштита и изнесуваат од 10-15% во развиените земји до 30-40% во некои земји во развој. Во Република Македонија, Фондот за здравствено осигурување во последните години става акцент на следењето и анализата на потрошувачката на лекови кои се на товар на ФЗОМ. Тоа е добар начин за оценување на рационалното користење на лекови, планирање на воведување на нови лекови на листата на лекови кои се на товар на ФЗОМ и планирање на финансиските средства на ФЗОМ наменети за лекови во примарната здравствена заштита.

Податоците за потрошувачка на лекови, ФЗО ги добива преку сопствен информатички систем директно од ПЗУ аптеките со кои Фондот има договор. Досега такви се 740 ПЗУ аптеки од вкупно 838 регистрирани во РМ, што е 88% од вкупниот број на аптеки.

Целта на оваа анализа е да се оцени и прикаже потрошувачката на лекови на рецепт на товар на ФЗОМ по градови во Р.Македонија односно по подрачни служби на ФЗОМ. Класификацијата на лековите е согласно АТС класификацијата. Потрошувачката на лековите е следена преку методологијата на дефинирани дневни дози (ДДД). Како целни групи на лекови, според најголема потрошувачка по износи и бројот на реализирани рецепти, анализирани се следните групи на лекови: антибиотици (J), лекови за кардиоваскуларен систем (C) и нервен систем (N).

За периодот 2008-2010 година најголема потрошувачка и најголем пораст на потрошувачката (од 21% на 25%) се забележува кај лековите од С групата. Следи потрошувачката на лековите од J групата (антибиотиците) кои се на второ место со константни 20% од вкупната потрошувачка. За истиот период, лековите од групата N се на трето место со околу 15% од вкупната потрошувачка.

За истиот период (2008-2010 година) според бројот на реализирани рецепти, први по потрошувачка се лековите од С групата со околу 40% од вкупниот број на реализирани рецепти. Лековите од N групата бележат пораст од 2% (од 13% на околу 15%) со што се на второ место, а лековите од групата J (антибиотиците) се трети со намалување на вкупниот број на реализирани рецепти од 15% на 13% (2%).

DRUG CONSUMPTION IN CROATIA 2007-2009 COMPARED TO NORWAY AND DENMARK

Sasa Zezelic, Pero Draganic, Sinisa Tomic

*Croatian Agency for Medicinal Products and Medical Devices
(HALMED)*

INTRODUCTION

The importance of collecting and analyzing drug consumption data is in correlation with improvement in disease therapy.

OBJECTIVES

To show overall drug consumption in Republic of Croatia and to compare with developed European countries with similar population.

METHODS

HALMED collected data on drug consumption from 2007-2009 from obliged entities. ATC classification was used. Data was considered in terms of DDD and monetary indicators. Results were compared with official publications on drug consumption from Norway and Denmark.

OBTAINED RESULTS

(for brevity, abstract will show data for 2009 only) Population of Croatia, Norway and Denmark in 2009 was 4.4, 4.7 and 5.5 million respectively. GDP per capita in Croatia, Norway and Denmark was €9.790, €54.447 and €38.546 respectively. Overall drug consumption in Croatia, Norway and Denmark was €525, €2.243 and €1.778 million and 1.386, 2.558 and 2.718 million DDD respectively. Main anatomical groups used in Croatia were C with €127 mill, N with €100 mill and A with €82mill. In Norway main anatomical groups used were L with €441 mill, N with €409 mill and C with €261 mill. In Denmark main anatomical groups used were N with €534 mill, R with €243 mill and C with €242 mill. Most used drugs in terms of DDD in Croatia were amlodipine, acetylsalicylic acid and atorvastatin with 75, 70 and 64 mill DDD respectively. In Norway most used drugs were acetylsalicylic acid, simvastatin and sodium fluoride with 123, 115 and 91 mill DDD respectively. In Denmark most used drugs were simvastatin, acetylsalicylic acid and paracetamol with 153, 147 and 124 mill DDD respectively.

MAIN CONCLUSIONS

Results show that higher GDP is followed by higher overall drug consumption, both in terms of DDD and monetary indicators. Additionally, all subject countries have similar rate of growth in drug consumption, in terms of DDD and monetary indicators.

REFERENCES

- Ronning M. et al, Drug Consumption in Norway 2003-2007, Folkehelseinstituttet, 2008
- Ronning M. et al, Drug Consumption in Norway 2004-2008, Folkehelseinstituttet, 2009
- Ronning M. et al, Drug Consumption in Norway 2005-2009, Folkehelseinstituttet, 2010
- Poulsen J. et al, Medicinal Product Statistics Denmark, 2005-2009 Total Sales, Danish Medicines Agency, 2010
- www.worldbank.org

DIAGNOSIS RELATED GROUPS (DRG) PAYMENT MODEL IN HOSPITALS AND THE ISSUE OF EXPENSIVE DRUGS

Gulija Marija

AD „Dr. Panovski“, Skopje, Macedonia

DRG payment model to hospitals in Macedonia was introduced in 2008 in 51 public hospitals having contracts with the Health Insurance Fund of Macedonia (HIF). Besides data collection on hospital related outputs, DRG was deployed as prospective payment system. Standardization and price predefinition enables service providers to plan resources, and the central national insurance (HIF) to have overview of the scope and type of services paid for, on national and health facility level. The weak point of the model is that model does not adjust for expenditures for treatments where real costs exceed the average price. Exceed in cost mainly regards use of specific expensive drugs/therapies and medical devices.

In Macedonia nationwide, there is no conducted structured national costing study and reliable data on inpatient acute budget for public health institutions. Thus, this study estimates and evaluates only expensive therapeutic approaches for first line treatment from data available within the DRG system. Expensive therapeutic first line approaches/therapies were defined. Starting criterion for selection was set as price per original package calculated for the duration of therapy, resulting in selection of 44 generics. Following the subsequent criteria of expensive therapy validation, 19 generics were defined linked to 24 DRG codes. After additional adjustments of all 665 DRG reference prices, still the costs of therapy including 13 generics cannot be covered by the reference price of 24 DRG codes. This first line expensive treatment drugs represent over 50% of the DRG reference price.

The study gives overview of some weaknesses of the methodology used to calculate DRG cost weights linked to implementation of expensive therapy, suggesting that national costing study is absolutely necessary for further implementation of DRG as payment methodology. Thus, it is very important to conduct a national costing study to understand real costs of services provided and consequently decide how and which expensive drugs/therapies should be excluded from DRG budget.

МОДЕЛОТ НА ПЛАЌАЊЕ КОН БОЛНИЦИТЕ ПРЕКУ ДИЈАГНОСТИЧКО СРОДНИ ГРУПИ (ДСГ) И ПРАШАЊАТА НА СКАПИТЕ ЛЕКОВИ

Гулија Марија

AD „Д-р Пановски“, Скопје, Македонија

Дијагностичко сродни групи (ДСГ) како модел на плаќање на болниците беше воведен во Македонија во 2008 година, во над 50 јавни болници кои имаа договор со Фондот за здравствено осигурување на Македонија (ФЗОМ). Освен за собирање на податоци за болничкото работење, ДСГ беше воведен како проспективен систем на плаќање на здравствените услуги. Стандардизацијата и предефинирањето на цените им овозможува на добавувачите на здравствени услуги да ги планираат ресурсите, а на здравственото осигурување (ФЗОМ) да има надзор на опсегот и видот на услуги за кои плаќа на национално и на ниво на здравствени институции. Слабата точка на овој модел се однесува на неможноста моделот да ги прилагоди трошоците за третмани при кои реалните трошоци ги надминуваат просечните стандардизирани цени. Надминувањето на предвидените трошоци најчесто се однесува на употребата на специфични скапи лекови/терапии и медицински помагала.

Во Македонија на национално ниво, не е спроведена структурирана студија за трошоците кои се однесуваат на буџетите за хоспитализација во јавните здравствени установи. Оваа студија врши проценка и евалуација само на скапите тераписки пристапи за прва линија на терапија од податоците кои се достапни во ДСГ системот. Беа дефинирани скапите терапии кои се прва линија на терапија. Почетен критериум за селекција беше поставен на ниво на цената за оригинално пакување на лекот сметана за должината на траење на вкупната терапија, што резултираше со селекција на 44 генерички форми. Натаму, со дополнителни критериуми за валидација на скапата терапија, 19 генерички форми беа дефинирани и соодветно поврзани со 24 ДСГ шифри. При натамошното ажурирање за сите 665 ДСГ референтни цени, цените на терапиите кои вклучуваат 13 генерички форми не можат да бидат покриени со референтните цени на 24 ДСГ шифри. Овие скапи терапии од прва линија претставуваат 50% од ДСГ референтната цена.

Оваа студија дава преглед на некои слабости на методологијата употребена за пресметување на трошоците на ДСГ кои се однесуваат на употребата на скапи терапии, која сугерира дека национална студија за трошоците е апсолутно неопходна за натамошна имплементација на ДСГ како метод за плаќање на болниците. Затоа е од огромна важност да се спроведе национална трошкова студија со цел да се разберат вистинските трошоци на услугите кои се пружаат и последователно се одлучи кои скапи лекови/терапии треба да се исклучат од ДСГ буџетирањето.

RATIONAL ANTIBIOTIC USE IN TREATMENT OF RESPIRATORY INFECTIONS IN CHILDREN UNDER FIVE YEARS OF AGE

Marina Petric¹, Svetlana Nestorovic², Ljiljana Tasic¹, Ana Sabo³

¹University of Belgrade – Faculty of Pharmacy

²Public Pharmacy Nis

³University of Novi Sad – Faculty of Medicine

INTRODUCTION

Upper respiratory tract infections are the most prevalent infections in childhood and it is important to know the use of antibiotics according to guidelines. Resistance to antibiotics is a major public health problem and it is associated with prior, usually inadequate, receipt of antibiotics. As limited information is available about antibiotic use among children in Serbia, data regarding antibiotics use in childhood are very valuable for assessment of rational antibiotic use, as well as for assessment of compliance with guidelines. National guidelines for antibiotic prescribing in the primary health care practice (NGA) recommends the following antibiotics for the treatment of respiratory and otorhinolaryngology diseases: amoxicillin as first line, than amoxicillin with clavulanic acid as a second line, and cephalosporines of II and III generation as a third line of therapy, while macrolides (firstly erythromycin, and than azithromycin) are recommended in the cases of penicillins and cephalosporins sensitivity (1).

OBJECTIVES

(i) To investigate prescription (Rx) antibiotic use in the children under five years of age (ii) To assess compliance with NGA.

METHODS

This was retrospective study for the period 2008-2010 within two populations of children in Nisava region: infants (up to 12 months of age) (3.377) and children aged 1-4 years (13.889). Data base of dispensed Rx drugs in the Public Pharmacy Nis was used as the source of data. The common pharmacoepidemiology unit was used for expression of antibiotics usage (defined daily doses (DDD) per thousand of inhabitants per day). The following respiratory and otorhinolaryngology diseases were observed (International classification of diseases 10): acute bronchitis (J20), chronic bronchitis (J42), pneumonia (J12-J18), tonsillopharyngitis (J02, J03), otitis media (H65), acute sinusitis (J01), and chronic sinusitis (J32).

RESULTS

The most used drugs among infants during the period 2008-2010 were penicillins, amoxicillin (10.227, 8.6410, and 9.0840 DDD/1000 inhabitants/day, respectively) and amoxicillin with clavulanic acid (4.3448, 4.0602, and 4.4160 DDD/1000 inhabitants/day). Cephalosporins were on the second place, with the following usage: cefixime (III generation) 2.8071, 2.7908, and 3.0018; cephalexin (I generation) 2.5276, 2.1463 and 2.3446 DDD/1000 inhabitants/day; and cefprozil (II generation) 1.3824, 1.7329, and 1.5788 DDD/1000 inhabitants/day, respectively. Macrolides were on the third place, and azithromycin dominated in this group of drugs with the following usage: 2.2029, 5.1022 and 2.5591 DDD/1000 inhabitants/day, respectively, while the use of erythromycin was only 0.075, 0.1399, and 0.7667 DDD/1000 inhabitants/day, respectively. Penicillins were, also,

the most frequently used antibiotics in the 1-4 years old children, but amoxicillin with clavulanic acid was dominated compare to amoxicillin (11.3997, 10.7532, and 9.7234 vs. 8.6314, 5.2057 and 8.1902 DDD/1000 inhabitants/day, respectively). Cephalosporins and especially macrolides, particularly azithromycin, were more used among this population compare to infants. The use of cefixime during the observed period was 4.8121, 5.2057, and 4.2972; cephalexin: 3.5122, 2.9521, and 2.7033; cefprozil: 2.2878, 2.3174, and 1.7379 DDD/1000 inhabitants/day. The use of azithromycin was 4.1783, 8.7857, and 4.2299, and the use of erythromycin was 0.3192, 0.3191, and 0.5188 DDD/1000 inhabitants/day, respectively. Observing the NGA for antibiotics use in respiratory infections, it is clear that the physicians are well informed and compliant with the recommendations for infants, while it is not within the children 1-4 years old. Moreover, exception of compliance with NGA could be seen in macrolides usage (high use of azithromycin and low use of erythromycin).

CONCLUSION

Besides physicians are compliant with the NGA in children of one year of age, the noncompliance with the recommendations in the 1-4 years old children was estimated and assessed as it could be non-rational. Further and broader assessment of antibiotics use in Serbia should be useful, as well as additional education of health care providers.

REFERENCES

1. Jankovic S. et al. Izbor i upotreba antibiotika u opštoj praksi. Nacionalni vodič za lekare u primarnoj zdravstvenoj praksi. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča u kliničkoj praksi. Valjevo print. Beograd. 2004.

RESEARCH OF BRAND MANAGEMENT ON MACEDONIAN PHARMACEUTICAL MARKET

Acevski Stevce

PharmaSwiss DOOEL, Skopje, Macedonia

AIM

- to research brand management on Macedonian pharmaceutical market.

INTRODUCTION

- company's value and capital could improve by creating, implementing and managing brands. It is a long time process, which demands constantly research of brand management, to identify, use and fight against everyday challenges of brand.

Materials and methods

- Questionary which will scan current brand position, on primary pharmaceutical sector. Anketed were pharmacists and pharmacy technicians who work in pharmacies in Macedonia. Questionary consists of 26 questions, divided in few subdivisions, which will help to achieve goals: profiling of Macedonian pharmaceutical market and positioning, qualification of position, rivals and avarenes for brand of researched company.

RESULTS

– Questionnaire was conducted in 42 pharmacies, through 35 pharmacists and 7 pharmacy technicians. One fourth of answered that basic field of service is dispense of medicines covered by reimbursement list, but half of all count on reimbursed and nonreimbursed medicines as main part of income. With specific questions we position brands of examined company, their strengths, weaknesses and threats. With gained results and SWOT analysis we create strategy for further brand management.

CONCLUSION

– brand management is constant process of interactive brand research, in terms of following brands health, for identifying threats, making strategy and appropriately react on brand defense.

ИСТРАЖУВАЊЕ НА МЕНАЦИРАЊЕТО СО БРЕНДОВИ НА МАКЕДОНСКИОТ ФАРМАЦЕВТСКИ ПАЗАР

Ацевски Стевче

ФармаСвис ДООЕЛ, Скопје, Република Македонија

ЦЕЛ

– да се изврши испитување на менаџирањето со брендови на македонскиот фармацевтски пазар.

ВОВЕД

– компаниската вредност и капитал може да се зголеми преку создавање, развивање и менаџирање на брендови. Тоа е долготраен процес кој бара постојано испитување на начинот на менаџирање со брендовите на пазарот, со цел успешно идентификување, искористување и спротиставување на секојдневните предизвици на брендот.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

- Анкетен прашалник со кој се утврди состојбата со брендовите, во примарниот фармацевтски сектор. Опфатени беа фармацевтите и фармацевтските техничари вработени во аптеките низ градовите во Република Македонија. Се состои од 26 прашања поделени во неколку делови со чија помош треба да се утврдат различните цели: определување на профилот на македонскиот фармацевтски пазар и определување на позицијата, конкурентите и свесноста за брендовите на испитуваната компанија

РЕЗУЛАТИ

- Анкетата беше спроведена во 42 аптеки, опфатени 35 фармацевти и 7 фармацевтски техничари. Четвртина од испитаниците сметаат дека основна дејност е издавање лекови од позитивна листа, а половина сметаат дека и позитивна и негативна листа имаат удел во прометот. Со специфични прашања е утврдена позицијата на брендовите на испитуваната компанија, нивните предности, слабости и закани. На основа на добиените резултати и извршената СВOT (SWOT) анализа креирана е предлог стратегија за натамошно менаџирање со брендовите.

ЗАКЛУЧОК

– менаџирањето со брендовите бара постојано интерактивно следење на „здравјето“ на брендот, со цел да се идентификуваат постојаните закани, да се подготви стратегија и да се реагира соодветно во одбрана на брендот.

INTERNET INFOVIGILANCE – PRACTICAL APPROACH IN BULGARIA

Hristina Lebanova, Malina Bileva, Ilko Getov

Medical University – Sofia, Faculty of Pharmacy

The theoretical definition of infovigilance is: “activity of error or inaccuracy notification in information sources which could be responsible for medication errors”. Information disseminated by drug information systems is not always easy to apply. Sometimes there is conflicting information in reference books, in journals, or in official sources.

The aim of the study is to assess the reliability of the drug-related information in the 10 most visited internet health related sites in Bulgaria, according to the search engine www.google.com. The following criteria were used: accuracy of the information, error/lack of information, discordance between the dates of the last revision of the patient leaflet, etc.

The test results show that in many cases the drug information in the internet sites contains errors and discrepancies. There is a need of monitoring the drug information available online in order to prevent patient confusion that could lead to medication errors.

In conclusion the internet gives the patients a rapid access to drug information. No one edits the vast amount of drug information on the internet to ensure its quality and accuracy. Some web sites may be accurate while others offer information that only may be advertising or worse harmful. There is a need of strict regulatory measures concerning the drug-related information in internet and its reliability.

REFERENCES

1. Åström K., J. Carlsson, I. Bates, D.G. Webb, C. Duggan, P. Sanghani and D. McRobbie, Desire for information about drugs - a multi-method study in general medical inpatients, *Pharm World Sci* 2000;22(4): 159-164.
2. Bouvy Marcel L., J. van Berkel, C. M. de Roos-Huisman, R. H.B. Meijboom, Patients' drug-information needs: a brief view on questions asked by telephone and on the internet, *Pharm World Sci* 2002;24(2): 43-45.
3. Fusier Isabelle, C.Tollier, M. Husson, Infovigilance: reporting errors in official drug information sources, *Pharm World Sci* (2005) 27: 166-169
4. Nader Forouz, K. Mousavizadeh, P. Ghafourifar, Patient sources for drug information in Iran: A questionnaire-based survey, *Pharm World Sci* (2008) 30: 764-767
5. Pharmaceuticals and the Internet, Drug Regulatory Authorities' perspective, World Health Organization 2001

ACTIVITIES OF HOSPITAL PHARMACISTS ASSOCIATION ON EUROPEAN LEVEL

Tajda Miharija Gala

University Medical Centre Ljubljana, Slovenia

The European Association of Hospital Pharmacists (EAHP) is the federation of national associations of hospital pharmacists, and represents more than 21000 hospital pharmacists in 31 countries across Europe. The main goal of the association is: to develop hospital pharmacy and to establish a common pharmaceutical policy in Europe, to work for the advancement of the position and role of the pharmacists in hospitals, to uphold the interests of hospital pharmacists from the member states of the European Union and the Council of Europe and to promote co-operation with other professional bodies.

EAHP ensures that the voice of hospital pharmacists is heard when new pieces of legislation of concern to them are being drafted and reviews all EU public documents that could affect their job. It was/is involved in several projects on EU level such as: a pan-European project on Patient Safety (EuNetPaS), the European pharmacovigilance system, a project on preparation of curriculum for the specialisation in hospital pharmacy recognised by the EU (PHARMINE), medication safety projects through use of codes on unit/single doses, the PHIS project - pharmaceutical pricing and reimbursement systems which aims to establish a comprehensive Pharmaceutical Health Information System and many others.

Numerous EAHP activities foster research and educational activities to allow hospital pharmacists of every European country to develop their activities like: Congress EAHP, Academy Summits, Academy Seminars, participation in working groups. Academy seminar is intended for hospital pharmacists from member states that joined the EU since 2004 and new EAHP members.


The members are encouraged to publish their research work and the advancement in hospital pharmacy practice on national level in the official journal of the EAHP: European Journal of Hospital Pharmacy EJHP (Practice and Science edition).

EAHP follows the development of the hospital pharmacy throughout Europe. Since 1995 a pan European survey is carried out in 5 years interval and a comparison of the results is performed, showing the trends of hospital pharmacy service in Europe. In 2010 the fourth EAHP survey was carried out and some preliminary results will describe the state of the art of hospital pharmacy services across Europe as well as their progress in the last five years.

The involvement of hospital pharmacists in various pharmacy activities will be presented: distribution of drugs in the hospital and distribution to outpatients, production and preparation, clinical engagement, new technologies used in practice, as well as trends in optimizing the safety and economic value of pharmacotherapy.

The outcomes of the survey are intended to help hospital pharmacy managers reflect on the extent to which pharmacists are engaged in various activities and to assess the role of pharmacists within their hospital. The results are useful for the comparative analysis of the current service level and future planning.

The knowledge on services and research provided by hospital pharmacists is fundamental to the educational and development programmes of the EAHP which will lead to diminishing the differences in hospital pharmacy practice in the European countries in future.



**ФАРМАКОЕКОНОМИЈА /
СОЦИЈАЛНА ФАРМАЦИЈА /
ФАРМАКОИНФОРМАТИКА**
постер презентациии

**PHARMACOECONOMY/
SOCIAL PHARMACY/
PHARMACOINFORMATICS**
poster presentations

DISPLAY THE TOP TEN DRUGS BY CONSUMPTION IN 2009. YEAR IN RS

Mirjana Đermanović, Slobodan Stanic, Saša Marić

Institute of Public Health of Republika Srpska

INTRODUCTION

Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification of drugs and a system of defined daily doses (DDD Defined Daily Dose) as the measurement unit is officially adopted and proposed by the World Health Organization (WHO) to monitor the use of drugs in specific populations or health care institution.

OBJECTIVE

Our goal is to show the ten drugs with the regime of issue of prescription, which is commonly used in 2009 in Republika Srpska in pharmacies.

METHODS

Display of medicaments traffic is based on data submitted from 281 pharmacies or 90.35% of the total number of registered pharmacies. The basis of making the display is a list of medications licensed for marketing. The database medicines are classified into 14 groups of the Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification system of drugs by WHO ATC and international non-proprietary name (INN). DDD value for the INN depending on the manner of its application are taken from "ATC classification of drugs and monitoring their use of the methodology with DDD units for drugs registered in Republika Srpska 2007" where we have used data from the "ATC index with DDDs 2006, the WHO Collaborating Centre for Drug Statistics METHODOLOGY, Oslo. Data on the number of Serbian population (1,437,477) were obtained from the Statistical Office.

RESULTS

Expressed in the number of DDD per 1000 inhabitants per day

1.enalapril	39.90
2.amlodipin	29.45
3.enalapril, hydrochlorothiazide	18:28
4.diklofenak	15.24
5.diazepam	10.40
6.izosorbid mononitrate	10.37
7.ranitidin	9.81
8.amokcilin	7.60
9.metoprolol	7.48
10.bromazepam	7.48

DISCUSSION

If we look at consumption top ten drugs, with the regime of issue of prescription, in Republika Srpska in 2009, in pharmacies expressed in number of DDD per 1000 inhabitants per day, these are medications from the following groups on the anatomical level:

1. Cardiovascular system
2. Nervous system
3. Musculo skeletal system
4. Alimentary tract and metabolism
5. Anti-infective drugs for systemic use

CONCLUSION

The most common are drugs used to treat diseases of the cardiovascular and nervous systems.

REFERENCES

1. ATC klasifikacija lijekova i praćenje njihove upotrebe metodologijom sa DDD jedinicama za lijekove registrovane u Republici Srpskoj 2007
2. ATC index with DDDs 2006, WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, Oslo

RETAIL AND REFERENCE PRICES OF TWENTY MOST USED MEDICINES FROM THE POSITIVE LIST AFTER THE INTRODUCTION OF THE REFERENCE PRICING SYSTEM IN THE REPUBLIC OF MACEDONIA

Bistra Angelovska¹, Verica Ivanovska¹,
Slavica Maleska Stojadinovik²

¹UGD Faculty of Medical Sciences, ²JZU General Hospital Ohrid

In Republic of Macedonia the supply of medicines reimbursable by the Health Insurance Fund (Positive list) was done centrally by international tenders up until 2004. The main selection criterion for choosing the best offer on the tender was the medicines price, which determined their price on the Positive list. The last international tender was conducted in 2004 and it was in force until the agreed quantities were exhausted.

In 2007, the first set of rules was introduced that determined the criteria and the procedure for setting up reference prices of medicines on the Positive list. It took under consideration the lowest offered price from the last medicines tender. In 2009 the second set of rules was adopted which used a comparative analysis of prices in the referent countries in the region. Reference price is the highest amount that the Fund would reimburse for a particular prescription medicine.

THE AIM

The aim of the study is to determine whether and how much the patient has to pay as a discrepancy between the retail and the reference price for twenty most used medicines from the Positive list available in the pharmacies in 2009.

METHODOLOGY

For this study a comparative statistical analysis was undertaken to determine the difference between the reference price and the retail price of twenty most used medicines from the Positive list in 2009. The prices of all marketed medicines with same INN and strengths were published in the Register of the Ministry of Health in 2009.

RESULTS

The introduction of the reference pricing system for medicines on the Positive list lead to reduced prices paid by the Health Insurance Fund, while the patients have to pay the discrepancy between the medicines retail and reference prices

DISCUSSION

The methodology of reference pricing of medicines enables the price reduction of the most used medicines by enlarging the market offer of medicines with the same generic name. That is probably due to two factors: (1) the grouping of medicines according to ATC classification and (2) the price comparison of same generics in the reference countries in the region.

As a comparison, in 2005 when the supply of medicines from the Positive list was done by tenders, the patient did not pay extra for the medicines. With this methodology, the variety of same generics was limited to only those medicines on the Positive list that won the tender, and their price was fixed.

THE CONCLUSION

With the reference price methodology the variety of medicines with the same generic name is increased and the Health Insurance Fund saves money on money dedicated to medicines. But this has an impact on the patient standard as the patient often has to pay the difference between the reference and the retail price of medicines available in the pharmacies.

REFERENCES

- Ангеловска Б. Рационална лекарствена употреба, фармацевтична доставка и ценообразување, като елементи на националната лекарствена стратегија в Република Македонија, автореферат докт. дисертација, Софија, 2006;
- Петрова Г. Модел на реформата на фармацевтичниот сектор в страни в преход от Балканскиот регион – анализ на използваните теоретични концепции, автореферат докт. дисертација, Софија, 2004;
- Собрание на Република Македонија, Закон за здравственото осигурување, Сл. Весник 119/2005, 50/2010 Скопје, 2005, 2010;
- Собрание на Република Македонија, Закон за лековите и медицинските помагала, Сл. Весник 106/2007; 88/2010, Скопје, 2007, 2010;
- Фонд за здравствено осигурување на Македонија, Правилник за утврдување на критериумите и постапка за одредување на референтни цени на лекови, Сл. Весник 8/2008, 158/2009, Скопје, 2008, 2009;
- Angelovska B., Ivanovska V., Changes in the prices of medicines from the medicines list reimbursed by the Health Insurance Fund in Republic of Macedonia after the implementation of reference pricing for medicine procurement, Fifth Congress of pharmacists of Serbia with international participation, Belgrade, 2010;
- Angelovska B., M.Bukilica, T. Todorov, G. Petrova. Comparative analysis of the prices of essential medicines between Bulgaria and Macedonia. 4th Pharm. Congress with international participation, Sofija, 2005;
- Banks G. et al., International pharmaceutical price differences-research report, Media and Publications, Commonwealth of Australia, 2001;
- Lopez-Casasnovas G, Puig-Junoy J. Review of the literature on reference pricing Department of Economics and Business Research Center for Health and Economics (CRES). Universitat Pompeu Fabra. Barcelona (Spain); 2000;
- Madrid Y, Quick J, Velasquez G. Health reform and drug financing World Health Organization; 1998 WHO/DAP/98.3;
- The guide to European pharmaceutical pricing and reimbursement system, Urch publ. London, 2001;
- WHO/HAI, Measuring medicine prices, availability, affordability and price components, 2nd edition, Geneva, 2008;
- www.moh-hsmp.gov.mk/Светска банка, Проект за управување со здравствен сектор www.fzo.org.mk /Фонд за здравствено осигурување на Македонија www.reglek.com.mk/ Биро за лекови, Министерство за здравство на Република Македонија

ПРОДАЖНИ И РЕФЕРЕНТНИ ЦЕНИ НА ДВАЕСЕТТЕ НАЈПОТРОШУВАНИ ЛЕКОВИ ОД ПОЗИТИВНАТА ЛИСТА НА ЛЕКОВИ НА РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА ПО ВОВЕДУВАЊЕ НА СИСТЕМОТ НА РЕФЕРЕНТНИ ЦЕНИ

Бистра Ангеловска¹, Верица Ивановска¹, Славица Малеска Стојадиновиќ²

¹УГД Факултет за медицински науки, ²ЈЗУ Општа болница Охрид

ВОВЕД

Во Република Македонија набавката на лековите од Листата на ле-

кови кои паѓаат на товар на Фондот за здравствено осигурување на Македонија (Позитивна листа) до 2004 година се вршеше централно преку организирање на меѓународни тендери. Главниот критериум за избор на најповолна понуда на тендерот беше цената на лековите, што ја одредуваше и цената на лековите од Позитивната листа. Последниот меѓународен тендер на лекови се одржа во 2004 година со важност до потрошување на договорените количини набавени лекови.

Во 2007 година се донесе првиот Правилник за утврдување на критериумите и постапката за одредување на референтните цени на лековите од Позитивната листа, кој во предвид ја земаше најниската понудена цена на последниот тендер на лекови. Во 2009 година се донесе вториот Правилник за референтни цени кој користи споредбена анализа на цените во референтните земји во регионот. Референтна цена е максималниот износ кој Фондот го обезбедува за одреден лек на рецепт

ЦЕЛ НА СТУДИЈАТА

Да се утврди дали и колку осигуреникот доплаќа од референтната до продажната цена за дваесетте најпотрошувани лекови од Позитивната листа на лекови достапни во аптеките во 2009 година.

МЕТОДИ

За оваа студија правена е споредбена статистичка анализа за определување на разликите меѓу референтната и продажната цена на дваесетте најпотрошувани лекови во 2009 година од Позитивната листа на лекови.

Цените на сите регистрирани препарати со исто ИНН и јачина се објавени во Регистрот на Министерството за здравство за 2009 година.

РЕЗУЛТАТИ

Со користење на Методологијата на референтни цени од 2009 год. за утврдување на цените на лековите од Позитивната листа, Фондот за здравствено осигурување плаќа пониски цени на лековите на листата, додека пациентите ја доплаќаат разликата меѓу продажната и референтната цена на лековите.

ДИСКУСИЈА

Методологијата на референтни цени овозможува намалување на цените на најпотрошуваниите лекови преку зголемена понуда на пазарот за лекови со исто генеричко име. Тоа најверојатно се должи на (1) групирање на лековите по АТЦ класификација и (2) споредување на цените на истата генерика во референтните земји од регионот.

За споредба, во 2005 година кога набавката на лекови од Позитивната цена одеше преку тендер, пациентот не доплаќаше за лековите. Со оваа методологија, асортиманската понуда беше лимитирана на оние лекови од Позитивната листа кои добиле на тендерот, а нивната цена беше фиксно утврдена.

ЗАКЛУЧОК

Со методологијата на референтни цени се зголемува асортиманот на лекови и се заштедува од средствата на Фондот за здравствено осигурување наменети за лекови. Но тоа се одразува на стандардот на пациентите кои најчесто ја доплаќаат разликата меѓу референтната и малопродажната цена на лековите достапни во аптеките.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Ангеловска Б. Рационална лекарствена употреба, фармацевтична доставка и ценообразување, како елементи на националната лекарствена стратегија в Република Македонија, автореферат докт. дисертација, Софија, 2006;
- Петрова Г. Модел на реформата на фармацевтичниот сектор в страни в преход от Балканскиот регион – анализ на използваните теоретични концепции, автореферат докт. дисертација, Софија, 2004;
- Собрание на Република Македонија, Закон за здравственото осигурување, Сл. Весник 119/2005, 50/2010 Скопје, 2005, 2010;
- Собрание на Република Македонија, Закон за лековите и медицинските помагала, Сл. Весник 106/2007; 88/2010, Скопје, 2007, 2010;
- Фонд за здравствено осигурување на Македонија, Правилник за утврдување на критериумите и постапка за одредување на референтни цени на лекови, Сл. Весник 8/2008, 158/2009, Скопје, 2008, 2009;
- Angelovska B., Ivanovska V., Changes in the prices of medicines from the medicines list reimbursed by the Health Insurance Fund in Republic of Macedonia after the implementation of reference pricing for medicine procurement, Fifth Congress of pharmacists of Serbia with international participation, Belgrade, 2010;
- Angelovska B., M.Bukilica, T. Todorov, G. Petrova. Comparative analysis of the prices of essential medicines between Bulgaria and Macedonia. 4th Pharm. Congress with international participation, Sofia, 2005;
- Banks G. et al., International pharmaceutical price differences-research report, Media and Publications, Commonwealth of Australia, 2001;
- Lopez-Casasnovas G, Puig-Junoy J. Review of the literature on reference pricing Department of Economics and Business Research Center for Health and Economics (CREDES). Universitat Pompeu Fabra. Barcelona (Spain); 2000;
- Madrid Y, Quick J, Velasquez G. Health reform and drug financing World Health Organization; 1998 WHO/DAP/98.3;
- The guide to European pharmaceutical pricing and reimbursement system, Urch publ. London, 2001;
- WHO/HAI, Measuring medicine prices, availability, affordability and price components, 2nd edition, Geneva, 2008;
- www.moh-hsmp.gov.mk/Светска банка, Проект за управување со здравствен сектор
www.fzo.org.mk /Фонд за здравствено осигурување на Македонија
www.reglek.com.mk/ Биро за лекови, Министерство за здравство на Република Македонија

In 2005 the pharmacies were privatized according to the modifications in the Law of Health Protection (Official Gazette 03/2004), and the galenic laboratory became part of the hospital pharmacy within the Public General Hospital in Ohrid.

Despite all these changes, the galenic laboratory produces magistral medicines for the pharmacies and galenic medicines for the hospitals and other health institutions on a continuous basis.

The objective of this study is to follow the consumption of magistral medicines in the galenic laboratory in Ohrid from 2001 to 2010 based on written prescriptions, composition, and dosage forms, and to analyse the influence of the changes in the legislation and in the pharmacy market on the production volume.

The conclusion of the study is that the modifications in the legislation, the consumption of broader selection of finished medicines and the competition of recently opened galenic laboratories have led to decrease in the production of magistral medicines in the galenic laboratory in Ohrid.

АНАЛИЗА НА ПОТРОШУВАЧКАТА НА МАГИСТРАЛНИ И ГАЛЕНСКИ ЛЕКОВИ ВО ПЕРИОДОТ ОД 2001 ДО 2010 ГОДИНА ВО ЈЗУ ОПШТА БОЛНИЦА ОХРИД

Славица Малеска Стојадиновиќ¹,
Бистра Ангеловска², Верица Ивановска²

¹ЈЗУ Општа болница Охрид,

²УГД Штип факултет за медицински науки

Изработката на лекови во Аптеките со примена на практичните и научните знаења е долгогодишна традиција во фармацевтската пракса и пружа можност за припрема на мали серии на лекови, како и лекови за поединечен пациент, за кои не е можно индустриско производство. Изработката на магистрални и галенски лекови/препарати во аптека се изведува во согласност со соодветни прописи и дефинирани услови, така да пациентот добива лек со добар квалитет, според пропишаните стандарди.

Изработката на лекови во аптека/галенска лабораторија е високо стручна работа на фармацевтот и се врши согласно добрите практики, прописите на фармакопеите или други стручни документи, при што фармацевтот проценува и носи одлуки за најисправната постапка и процедурите што обезбедуваат квалитет на изработениот препарат. Во периодот од 2001 до 2005 година Градската аптека во Охрид во својот состав имаше повеќе аптеки и галенска лабораторија, во која се изработуваа магистрални и галенски препарати за потребите на аптеките во состав на установата.

2005 година согласно промените во Законот за здравствената заштита (Сл. Весник 03/2004) е извршена приватизација на аптеките, а галенската лабораторија до денеска е во состав на болничката аптека при ЈЗУ Општа болница Охрид.

Галенската лабораторија при болничката аптека во ЈЗУ Општа болница Охрид, и покрај настанатите промени во титуларот, во континуитет произведува магистрални лекови за потребите на аптеките и галенски препарати за потребите на болницата и другите здравствени установи.

Во овој труд имаме за цел да ја проследиме потрошувачката на

ANALYSIS OF THE CONSUMPTION OF MAGISTRAL AND GALENIC MEDICINES FROM 2001 TO 2010 IN THE PUBLIC GENERAL HOSPITAL OHRID

Slavica Maleska Stojadinovik¹, Bistra Angelovska²,
Verica Ivanovska²

¹Public General Hospital Ohrid,

²UGD Stip, Faculty of Medicinal Sciences

The production of medicines in pharmacies based on practical and scientific know-how has been a long tradition in the pharmacy practice. It gives the opportunity to produce small batches of medicines as well as medicines for a single patient where industrial manufacture is not an option.

The production of magistral and galenic medicines is performed in line with respective regulations and under defined conditions, so that the patient is given a medicine of good quality according to determined standards.

The production of medicines in a pharmacy/galenic laboratory is a highly scientific activity, and it is undertaken in correspondence to good practices, the pharmacopeia directions and other scientific documents. Thereby, the pharmacist makes judgments and takes decisions about the correct process and procedure in order to secure the quality of the produced medicines.

During the period 2001 – 2005 the State pharmacy in Ohrid comprised of a number of pharmacies and a galenic laboratory, where magistral and galenic medicines were prepared to meet the needs of its own pharmacies.

магистралните лекови во галенската лабораторија во Охрид во периодот 2001-2010 година по број на пропишани рецепти, состав, дозажна форма, како и влијанието на промените во регулативата и фармацевтскиот пазар врз обемот на производство.

Од направената анализа може да се заклучи дека промената во законските решенија и користењето на поширок асортиман на готови лекови, како и кокуренцијата од новоотворените галенски лаборатории доведуваат до пад на производството на магистрални лекови во галенската лабораторија во Охрид.

COST – EFFECTIVENESS ANALYSIS OF ANTIMICROBIAL DRUGS USED IN THE TREATMENT OF ACUTE EXACERBATIONS OF CHRONIC BRONCHITIS AND CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Acevski Stevce¹, Sterjev Zoran², Suturkova Ljubica², Zareski Rubin²

¹PharmaSwiss, Republic of Macedonia ²University “St. Cyril and Methodius”, Faculty of Pharmacy Skopje, Republic of Macedonia

OBJECTIVE

Cost-effective analysis of most commonly used antimicrobial drugs for treatment of acute exacerbations of chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

INTRODUCTION

COPD is a lung disease characterized by chronic obstruction of lung air-flow that interferes with normal breathing and is not fully reversible. Acute exacerbations of COPD are an abrupt increase in symptoms of shortness of breath and/or wheezing, often associated with increase in production of purulent sputum. Hospitalization may be required if the symptoms are severe. If symptoms are milder, one may choose to be treated as an outpatient.¹ Among other treatment agents, antibiotics are often used to treat bacterial infections. Approximately 50% of acute exacerbations are due primarily to the bacteria *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*.² Five antibiotic regimens were used in the treatment of acute exacerbation of chronic pulmonary disease on outpatients. Data showed close range of effectiveness, we carry out cost effectiveness analysis for antibiotic regimens.

MATERIAL AND METHODS

Data for the efficacy and tolerability of five most commonly used antibiotics for the treatment of acute exacerbations of chronic bronchitis and COPD was retrieved from published study.³ Results for the efficacy and tolerability were in correlation with six published studies, for antibiotic treatment in COPD. Antibiotics included were: amoxicillin/clavulanic acid (AMO/CL) 875 mg/125 mg twice daily, cefuroxime (CEFUR) 250 mg twice daily, cefixime (CEFIX) 400 mg once daily, clarithromycin (CLARI) 500 mg twice daily and ciprofloxacin (CIPRO) 500 mg twice daily. Prices for the used antibiotics were obtained from Ministry of Health; Bureau for medicines.⁴ Cost-effectiveness analysis was conducted based on collected data.

RESULTS

Effectiveness of treatment showed similar clinical success in the five antibiotic groups from 68.9% with AMO/CL, CLARI 72.7%, CEFIX 73.5%, CEFUR 75% and CIPRO 77.1%.

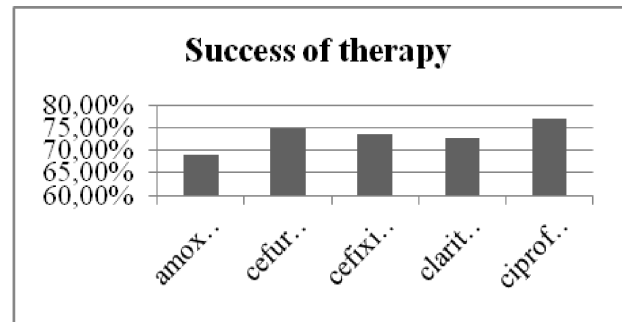


Figure 1: Success of therapy of acute exacerbations of COPD with amoxicillin/clavulonic acid, clarithromycin, cefixime, cefuroxime and ciprofloxacin

According to the data for mean time to resolution of the symptoms or return to the baseline severity results showed that AMO/CL patients need 6.8 days, 6.1 days for CEFUR, 6.4 days for CEFIX, 6.4 days with CLARI and 6.5 days for CIPRO patients.

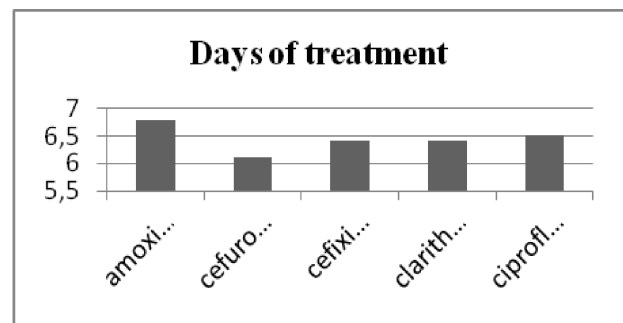


Figure 2: Mean time to relief of the symptoms in the five groups: amoxicillin/clavulonic acid, cefuroxime, cefixime, clarithromycin and ciprofloxacin

Cost-effective ratio (CER) analysis showed that CEFUR and CIPRO are more cost-effective than other three antibiotics (CEFUR ICER = - 670 and ICER = - 233 for CIPRO).

	E	C	Δ C	Δ E	ICER
AMO/CL	0,69	5,23	5,23	0,69	7,58
CLARI	0,73	6,80	1,57	0,04	38,29
CEFIX	0,74	18,53	11,73	0,01	2346,70
CEFUR	0,75	8,47	-10,05	0,02	-670,32
CIPRO	0,77	3,58	-4,90	0,02	-233,26

Table 1. Incremental cost effectiveness ratio (ICER) for amoxicillin/clavulonic acid (AMO/CL), clarithromycin (CLARI), cefixime (CEFIX), cefuroxime (CEFUR) and ciprofloxacin (CIPRO) used in the treatment of acute exacerbations of COPD

Abbreviations: E – Average effectiveness, C – Cost of treatment, Δ C – difference of cost of treatment, Δ E – difference of effectiveness, ICER – incremental cost effectiveness ratio
ICER analysis showed dominant cost-effectiveness of CIPRO over the other four antibiotics.

	E	C	Δ C	Δ E	ICER
CLARI	0,73	6,80	6,80	0,73	9,31
CIPRO	0,77	3,58	-3,22	0,04	-78,53

Table 2. Incremental cost effectiveness ratio (ICER) for clarithromycin (CLARI) and ciprofloxacin (CIPRO) used in the treatment of acute exacerbations of COPD

Abbreviations: E – average effectiveness, C – cost of treatment, Δ C – difference of cost of treatment, Δ E – difference of effectiveness, ICER – incremental cost effectiveness ratio

CONCLUSION

Cost-effectiveness analysis of five antibiotic regimens most commonly used for treatment of acute exacerbations of COPD showed significant advantage of cost savings and efficacy when using CIPRO over the other four antibiotic regimens.

REFERENCES

- World Health Organisation – Definitions of COPD – <http://www.who.int/respiratory/copd/> (last accessed 21.04.2011)
Ball P, Chodosh S, Grossman R, et al. Causes, epidemiology and treatment of bronchial infections. *Infect Med.*2000;17:186-198.
Minov J, Karadzinska-Bislimovska J, Petrova T, et al. Efficacy and Tolerability of Various Antimicrobial Regimens In the Treatment of Exacerbations of Chronic Bronchitis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Outpatients: *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 2009 Jun 15; 2(2):115 – 120.
Bureau for medicines, Ministry of Health, published on official web page www.reglek.com.mk; (last accessed on 21.04.2011)

симптомите се полесни пациентот е амбулантски.¹ Покрај другите препарати, антибиотици често се користат за третирање на бактериската инфекција. Околу 50 % од акутните екзацербации се предизвикани од *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и *Moraxella catarrhalis*.² Пет антибиотици беа користени за третман на акутни екзацербации на ХОББ кај амбулантски пациенти. Податоците покажаа тесен опсег на ефикасност, извршивме трошок-ефикасност анализа.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

Податоците за ефикасноста и подносливоста на антибиотиците користени за третман на акутна екзацербација на ХОББ беа добиени од објавена студија.³ Резултатите се во позитивна корелација со шест објавени студии, за употреба на антибиотици при ХОББ. Користени беа: амоксицилин/клавулонска киселина (АМО/КЛ) 875 mg/125 mg два пати на ден, цефуроксим (ЦЕФУР) 250 mg два пати на ден, цефиксим (ЦЕФИК) 400 mg еднаш дневно, кларитромицин (КЛАРИ) 500 mg два пати на ден и ципрофлоксацин (ЦИПРО) 500 mg два пати на ден. Цените за користените антибиотици беа добиени од официјалниот ценовник за единствени цени на Бирото за лекови, при Министерството за здравство.⁴ Трошок-ефикасност анализа беше извршена со собраните податоци.

РЕЗУЛТАТИ

Ефикасноста на третманот покажа блиски граници на успех 68.9% за АМО/КЛ, КЛАРИ 72.7%, ЦЕФИК 73.5%, ЦЕФУР 75% и ЦИПРО 77.1%.

ТРОШОК-ЕФИКАСНОСТ АНАЛИЗА НА АНТИБИОТИЦИ КОРИСТЕНИ ЗА ТРЕТМАН НА АКУТНА ЕКЗАЦЕРБАЦИЈА ОД ХРОНИЧЕН БРОНХИТИС И ХРОНИЧНА ОБСТРУКТИВНА БЕЛОДРОБНА БОЛЕСТ (ХОББ)

Ацевски Стевче¹, Стерјев Зоран²,
Шутуркова Љубица², Зарески Рубин²

¹Фармасвис, Република Македонија ²Универзитет „Св.Кирил и Методиј“, Фармацевтски факултет, Скопје, Република Македонија

ЦЕЛ

Трошок-ефикасност анализа на најчесто користените антибиотици за третман на акутни екзацербации на хроничен бронхитис и хронична обструктивна белодробна болест (ХОББ).

ВОВЕД

ХОББ е болест на белите дробови, која се одликува со хронична обструкција на дишењето, кое го отежнува нормалното дишење, често е неповратно. Акутни екзацербации на ХОББ се нагло влошување на симптомите од недостаток на здив и/или тешко дишење, често придружено со зголемена секреција на пурулентен спутум. Хоспитализација е потребна при потешки симптоми, а ако



Слика 1: Ефикасност на антибиотска терапија на акутни екзацербации на ХОББ

Според податоците просечно времетраење на терапијата се движеше од 6.8 дена за АМО/КЛ, 6.1 за ЦЕФУР, 6.4 за ЦЕФИК, 6.4 за КЛАРИ и 6.5 дена за ЦИПРО.



Слика 2. Просечно времетраење на антибиотска терапија на акутни екзацербации на ХОББ

Трошок-ефикасност анализата покажа дека ЦЕФУР и ЦИПРО се повеќе трошок-ефикасни од другите три антибиотици. (ЦЕФУР ИЦЕР = - 670 и ИЦЕР = - 233 за ЦИПРО).

Табела 1 Растечки трошок-ефикасност однос (ИЦЕР) за амоксицилин/клавулонска (АМО/КЛ), кларитромицин (КЛАРИ), цефиксим (ЦЕФИК), цефуроксим (ЦЕФУР) и ципрофлоксацин (ЦИПРО) користени за третман на акутни екзацербации на ХОББ

	Е	Т	? Т	? Е	ИЦЕР
АМО/КЛ	0,69	5,23	5,23	0,69	7,58
КЛАРИ	0,73	6,80	1,57	0,04	38,29
ЦЕФИК	0,74	18,53	11,73	0,01	2346,70
ЦЕФУР	0,75	8,47	-10,05	0,02	-670,32
ЦИПРО	0,77	3,58	-4,90	0,02	-233,26

Кратенки: Е – Просечна ефикасност, Т – Трошок на третманот, Δ Т – разлика на трошок на третманот, Δ Е – разлика на ефикасност на третманот, ИЦЕР – растечки трошок-ефикасност однос ИЦЕР покажа доминантна трошок-ефикасност на ЦИПРО во однос на другите четири антибиотици.

Табела 2. Растечки трошок-ефикасност однос (ИЦЕР) за кларитромицин (КЛАРИ) и ципрофлоксацин (ЦИПРО) користени за третман на акутни екзацербации на ХОББ

	Е	Т	? Т	? Е	ИЦЕР
КЛАРИ	0,73	6,80	6,80	0,73	9,31
ЦИПРО	0,77	3,58	-3,22	0,04	-78,53

Кратенки: Е – Просечна ефикасност, Т – Трошок на третманот, Δ Т – разлика на трошок на третманот, Δ Е – разлика на ефикасност на третманот, ИЦЕР – растечки трошок-ефикасност однос

ЗАКЛУЧОК

Трошок-ефикасност анализата на пет антибиотици најчесто користени за третман на акутни екзацербации на ХОББ покажаа значителна заштеда и подобра ефикасност при користење на ЦИПРО во однос на другите четири антибиотици.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- World Health Organisation – Definitions of COPD – <http://www.who.int/respiratory/copd/> (last accessed 21.04.2011)
- Ball P, Chodosh S, Grossman R, et al. Causes, epidemiology and treatment of bronchial infections. *Infect Med.*2000;17:186-198.
- Minov J, Karadzinska-Bislumovska J, Petrova T, et al. Efficacy and Tolerability of Various Antimicrobial Regimens In the Treatment of Exacerbations of Chronic Bronchitis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Outpatients : Macedonian Journal of Medical Sciences, 2009 Jun 15: 2(2):115 – 120.
- Bureau for medicines, Ministry of Health, published on official web page www.reglek.com.mk; (last accessed on 21.04.2011)

PHARMAECONOMIC ANALYSIS OF RIVAROXABAN FOR PREVENTION OF VTE IN PATIENTS UNDERGOING ELECTIVE HIP AND KNEE REPLACEMENT SURGERY

Sterjev.Z¹, Petrovska Angelovska.A², Gavazova Kozareva.K²

¹University “St.Cyril and Methodius” Faculty of Pharmacy Skopje, Republic of Macedonia

²Bayer d.o.o. - Representative Office Skopje

INTRODUCTION

Rivaroxaban is a new oral highly selective, direct inhibitor of coagulation factor Xa. It is indicated in the prevention of venous thromboembolism (VTE) in adult patients undergoing major lower limb operations.

OBJECTIVE

Determining the cost-effectiveness of rivaroxaban vs enoxaparin in thromboprophylaxis after complete hip and knee replacement surgery in Macedonia.

MATERIALS AND METHODS

To realize the goal, pharmaeconomic cost-effectiveness study is applied. Required efficiency data was taken from four phase III studies (RECORD 1, 2, 3 and 4) conducted in patients with elective hip and knee replacement surgery. These cost data was obtained from public data available from DRG of the Health Insurance Fund of Macedonia and the official data for the price of drugs published on the website of the Ministry of Health of the Republic of Macedonia

RESULTS

Implemented pharmaeconomic analysis suggests a minimum reduction of material costs by around 5900 denars per patient if rivaroxaban is used in Republic of Macedonia for the prevention of venous thromboembolism (VTE) in adult patients undergoing major lower limb operations. Unfortunately, in Macedonia there are no adequate data on the effectiveness of treatment with rivaroxaban and other products for prevention of venous thromboembolism (VTE), so ICER as a real pharmaeconomic indicator cannot be calculated. If we consider data on the effectiveness of this medicine from other countries where trials are conducted and economic calculations according to data available from the Republic of Macedonia we can conclude that cost-effectiveness ratio is in favor of rivaroxaban.

CONCLUSION

The results of a conducted pharmaeconomic study are consistent with the results obtained in other countries that explicitly confirm pharmaeconomic and therapeutic advantage of rivaroxaban compared to other products intended for the prevention of venous thromboembolism. Accordingly and in accordance with the opinion of the evaluation committee (ERG - Evidence Review Group) at the National Institute of Health and Clinical Expertise (NICE), rivaroxaban should be recommended as an option for prevention of venous thromboembolism in adult patients undergoing surgical operations of total hip or total knee replacement.

REFERENCES

- Turpie AG, Lassen MR, Eriksson BI, Gent M, Berkowitz SD, Misselwitz F, Bandel TJ, Homering M, Westermeier T, Kakkar AK; Rivaroxaban for the prevention of venous thromboembolism after hip or knee arthroplasty. Pooled analysis of four studies; Thromb Haemost. 2011 Mar;105(3):444-53. Epub 2010 Dec 6
- Kwong LM. Cost-effectiveness of rivaroxaban after total hip or total knee arthroplasty. Am J Manag Care. 2011 Feb;17(1 Suppl):S22-6.
- Kakkar AK, Brenner B, Dahl OE, Eriksson BI, Mouret P, Muntz J, Soglian AG, Pap AF, Misselwitz F, Haas S; RECORD2 Investigators. Extended duration rivaroxaban versus short-term enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total hip arthroplasty: a double-blind, randomised controlled trial. Lancet. 2008 Jul 5;372(9632):31-9. Epub 2008 Jun 24.
- Turpie AG, Lassen MR, Davidson BL, Bauer KA, Gent M, Kwong LM, Cushner FD, Lotke PA, Berkowitz SD, Bandel TJ, Benson A, Misselwitz F, Fisher WD; RECORD4 Investigators. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty (RECORD4): a randomised trial. Lancet. 2009 May 16;373(9676):1673-80. Epub 2009 May 4.
- Duggan ST, Scott LJ, Plosker GL. Rivaroxaban: a review of its use for the prevention of venous thromboembolism after total hip or knee replacement surgery. Drugs. 2009;69(13):1829-51

ФАРМАКОЕКОНОМСКА АНАЛИЗА ЗА РИВАРОКСАБАН ЗА ПРЕВЕНЦИЈА НА ВТЕ КАЈ ПАЦИЕНТИ ПОДЛОЖЕНИ НА ЕЛЕКТИВНА ЗАМЕНА НА КОЛК КОЛЕНО

Зоран Стерјев¹, Ана Петровска Ангеловска²,
Костадинка Гавазова Козарева²

¹Фармацевтски факултет-Скопје

²Баер д.о.о. Претставништво Скопје

ВОВЕД

Rivaroxaban претставува нов орален високоселективен директен инхибитор на коагулациониот фактор Ха. Индициран е во превенција на венска тромбемболија (ВТЕ) кај возрасни пациенти подложени на големи операции на долен екстремитет.

ЦЕЛ

Определување на цена-ефикасност на rivaroxaban vs енохепарин во тромбопрофилактика после комплетна замена на колк и колена во РМ.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

За реализација на поставената цел применета е фармакоекономска студија цена-ефикасност. Потребните податоци за терапевтската ефикасност се превземени од 4 студии од фаза III (RECORD 1, 2, 3 и 4), спроведени кај пациенти со елективна замена на колк и колена. Трошковните податоци се добиени од Јавно достапните податоци од ДРГ на Фондот за здравствено осигурување на РМ и официјалните податоци за цената на лековите објавени на веб страната на Министерството за здравство на Р.Македонија

РЕЗУЛТАТИ

Спроведената фармакоекономска анализа упатува на минимално намалување на материјалните трошоци за околу 5 900 денари по пациент доколку во Р.Македонија за превенција на венска тромбемболија (ВТЕ) кај возрасни пациенти подложени на големи операции на долен екстремитет се користи rivaroxaban. За жал во Р.Македонија не постојат соодветни податоци за ефикасноста од терапијата со rivaroxaban и останатите препарати наменети за

превенција на венска тромбемболија (ВТЕ), поради што неможе да се пресмета ICER како реален фармакоекономски показател. Доколку се земат во предвид податоците за ефикасноста на овој лек од други земји каде се вршени испитувања и економските пресметки според достапните податоци од Р.Македонија се заклучува дека цена-ефикасност коефициентот е во полза на rivaroxaban.

ЗАКЛУЧОК

Добиените резултати од спроведената фармакоекономска студија се во согласност со резултатите добиени во други земји во кои недвосмислено се потврдува фармакоекономската и терапевтската предност на ривароксабанот во однос на останатите препарати наменети за превенција на венска тромбемболија. Според тоа а и во согласност со мислењето комитетот за евалуација (ERG – Evidence Review Group) при Националниот Институт за Здравство и Клиничка Експертиза (NICE), rivaroxaban треба да биде препорачан како опција за превенција на венски тромбоемболизам кај возрасни пациенти подложени на хируршки операции на тотална замена на колк или тотална замена на колена.

ЛИТЕРАТУРА

- Turpie AG, Lassen MR, Eriksson BI, Gent M, Berkowitz SD, Misselwitz F, Bandel TJ, Homering M, Westermeier T, Kakkar AK; Rivaroxaban for the prevention of venous thromboembolism after hip or knee arthroplasty. Pooled analysis of four studies; Thromb Haemost. 2011 Mar;105(3):444-53. Epub 2010 Dec 6
- Kwong LM. Cost-effectiveness of rivaroxaban after total hip or total knee arthroplasty. Am J Manag Care. 2011 Feb;17(1 Suppl):S22-6.
- Kakkar AK, Brenner B, Dahl OE, Eriksson BI, Mouret P, Muntz J, Soglian AG, Pap AF, Misselwitz F, Haas S; RECORD2 Investigators. Extended duration rivaroxaban versus short-term enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total hip arthroplasty: a double-blind, randomised controlled trial. Lancet. 2008 Jul 5;372(9632):31-9. Epub 2008 Jun 24.
- Turpie AG, Lassen MR, Davidson BL, Bauer KA, Gent M, Kwong LM, Cushner FD, Lotke PA, Berkowitz SD, Bandel TJ, Benson A, Misselwitz F, Fisher WD; RECORD4 Investigators. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty (RECORD4): a randomised trial. Lancet. 2009 May 16;373(9676):1673-80. Epub 2009 May 4.
- Duggan ST, Scott LJ, Plosker GL. Rivaroxaban: a review of its use for the prevention of venous thromboembolism after total hip or knee replacement surgery. Drugs. 2009;69(13):1829-51

ASSESSMENT REPORT OF ADVERSE DRUG REACTION RECEIVED BY HEALTHCARE PROFESSIONALS

Jasmina Babic, Marko Eric, Jelena Pilic

Medicines and Medical Devices Agency of Serbia

National pharmacovigilance center is performing assessment of reported adverse drug reaction. Reported case is estimated from prospective of seriousness, expectancy and causality (causal relationship between drug-reaction) analyzing available information using relevant literature. In order to define this process as good as possible, connection diagram was implemented. Connection diagram describes order of activity and decisions within the process which were implemented in one organizational unit. Main goal of this connection diagram is precise definition of control points within the process of assessment report of adverse drug reaction received by healthcare professionals. Diagram always starts describing the function of the person and activity with which inputs (incoming elements) are feed

to the process and after that diagram contains functions of the persons who are continuing the process, titles of singular activities and unambiguous realization criteria of activity and decisions, deadlines of work process realization, as well as outputs (out-coming elements) together with function of the person to whom the outputs are given.

In the connection diagram processes are presented with symbols which are divided into two parts – fields: in upper field we have function of the person who is responsible, while in the lower field we have title of the activity (decision). In the diagram making symbols are used for diagram start and end, activity, decision making process (questionnaire), written document – note (is related to activity within which the document is established or changed), diagram connection line (represent connections between diagram boxes) and diagram direction flow arrow.

Connection diagrams are additional document type used for Quality Management System, used for ambiguous presentation of work processes. Making connection diagram, detailed description of activity and decisions is presented, which are used in NPC during the process of assessment drug reaction.

Making connection diagram enables easier monitoring of implementation of all activities related to assessment report of adverse drug reaction received by healthcare professionals, better job coordination performed by managers and undisputable responsibility overview of all persons being a part of the process.

REFERENCES

Eudralex, Volume 9A, Pharmacovigilance-Medicinal Products for Human and Veterinary Use; ICH E2D: Post-Approval Safety Data Management: Definitions and Standards for Expedited Reporting 2003; Law on medicines and medical devices; Rules defining the manner for reporting, collecting data and monitoring adverse reactions of medicinal products.

PATIENT PACKAGE INSERT

Vlacho.B, Naumovska.Z, Sterjev.Z

University "St.Cyril and Methodius" Faculty of Pharmacy Skopje, Republic of Macedonia

INTRODUCTION

Patient Package Insert (PPI) can be defined as: the necessary quantum of product information prepared from producers, approved by an authorized bodies and intended primarily for users of pharmaceutical products. PPI consist a balanced set of information which includes information about correct application of the drug (procedural instructions), warnings (risk-related information) and information about the potential benefits (benefit information). The contents of the PPI should be designed and adapted for the general population. During preparation of this written document it should be observed following specifics: the category of information and specific titles to be discussed, quantum information to be presented in any particular part of the PPI and a total length of the entire document, style and way of writing which will be applied in the preparation of the document, document format and technical details (size and type style letters which will be used) educational level of writing style that is applied, the organization of document, drafting and graphic illustrations. If instructions for use of the drug are well designed and readable it will increase number of people who will be able to use the information, including older, children and adolescents, people with modest literary skill and those with impaired vision. The regulation of the issues related to quality of leaflet is through preparation of

appropriate guidelines for the making of PPI and their implementation with the European pharmaceutical legislation and regulations in our country is a basic prerequisite to ensure consistent and standardized quality of PPI. Moreover, it is important to note that these guidelines should be seen as a model which contains the minimum standards for preparation and testing of the patient information leaflet.

OBJECTIVE

The purpose of this analysis is to assess the quality of the Patient Package Insert of pharmaceutical products that are available on the market in our country and to determine their compliance or noncompliance with the existing and permanent regulations in R. Macedonia.

MATERIALS AND METHODS

For the realization of this goals it was designed Assessment Questionnaire, consisting of 48 questions that are answerable according to the principle of selecting one of several possible answers. By answering the questions, there were evaluated: the writing style, quantity and quality of information availability to users, design and layout of information. The evaluation is made of 200 randomly selected internal medicine indications from different manufacturers and 100 internal guidelines of diet supplements available on the pharmaceutical market in R. Macedonia. Selection for evaluation of the patient package insert was made on the most commonly used medicine indications, such as groups of J-anti-infective drugs for systemic use, N-nervous system and C-cardiovascular system drugs according to the ATC classification.

RESULTS

The results of the evaluation conducted indicate still insufficient uniformity and compliance with PPI guidelines legislation recommendation. This phenomenon is particularly apparent in patient information leaflets for food supplements that are available on the pharmaceutical market in R.Macedonia, which have very important application.

REFERENCES

Bogaert M, Vander Stichele R, Kaufman JM, Lefebvre R, (eds). Patient package insert as a source of drug information. Amsterdam: Excerpta Medica; 1989.
Collier J. Patient-information leaflets and prescriber competence. Lancet 1998;352:1724.
Newby DA, Hill SR, Barker BJ, Drew AK, Henry DA. Drug information for consumer should it be disease or medication specific? Results of a community survey. Aus NZJ Public health 2001; 25:564-570
Consumers Association. Patient information. What's the prognosis? Policy report. <http://www.which.net/campaigns/health/patientinformation/index.html>, 2003, accessed 25 November 2005
Guideline on the readability of the labeland. package leaflet of medicinal products for human use, 12 Januar 2009

ВНАТРЕШНО УПАТСТВО

Влачо.Б, Наумовска.З, Стерјев.З

Национален Фармакоинформативен Центар, Универзитет Св. Кирил и Методиј-Скопје, Р.Македонија

ВОВЕД

Внатрешното упатство на лековите и другите фармацевтски производи кое што се наоѓа запакувано во надворешната амбалажа на фармацевтскиот производ, може да се дефинира како: неопходен квантум на информации за производот подготвени од страна на самите производители, одобрени од авторизиран извор и наменети пред

се за корисниците на фармацевтските производи. Внатрешното упатство се состои од избалансиран сет на информации кој во себе вклучува информации за правилната примена на лекот (процедурални инструкции), предупредувања (информации поврзани со ризикот) и информации за потенцијалните придобивки (бенефит информации). Содржината на упатството треба да биде наменета и прилагодена за општата популација. При изготвувањето на овој пишан документ треба да бидат запазени следниве специфики: категоријата на информации и специфични наслови кои треба да бидат дискутирани, квантум на информации кои треба да бидат презентирани во секој посебен дел од упатството и вкупна должина на целиот документ, стил и начин на пишување кој што ќе се применува при изработката на документот, форматот на документот и техничките детали (големина и вид на користен стил и букви), едукациското ниво на стилот на пишување кој се применува, организацијата на документот, графичката изработка и илустрации. Доколку упатството за примена на лекот е добро дизајнирано и читливо се зголемува бројот на луѓе кои се во можност да ги користат информациите, вклучувајќи ги повозрасните деца и адолесцентите, луѓето со скромна литературна вештина и оние со нарушен вид. Регулацијата на проблематиката поврзана со квалитетот на внатрешното упатство преку изготвување на соодветни водичи за изработка на внатрешни упатства и нивно имплементирање во европската регулатива и фармацевтската регулатива во нашата земја претставува основен предуслов кој треба да осигура постојан и стандардизиран квалитет на внатрешните упатства. Притоа, мошне е значајно да се напомене дека на овие водичи треба да се гледа како на модел кој ги содржи минимум стандардите за изготвување и тестирање на внатрешното упатство.

ЦЕЛ

Целта на оваа анализа е да се изврши проценка на квалитетот на дел од внатрешните упатства на фармацевтските препарати кои се достапни на пазарот во нашата земја и да се утврди нивната усогласеност или неусогласеност со постојаната регулатива во Р. Македонија

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

За реализирање на поставените цели конструиран е евалуационен прашалник, кој се состои од 48 прашања на кои се одговара според принципот на избор на еден од повеќе можни одговори. Преку одговарања на прашањата се евалуирани: стилот на пишување, квантитетот и квалитетот на достапните информации за корисниците, дизајнот и распоредот на информациите. Евалуацијата е направена на 200 случајно избрани внатрешни упатства од лекови од различни производители и 100 внатрешни упатства од додатоци на исхрана кои се достапни на фармацевтскиот пазар во Р.Македонија. Поради најчестата фреквенција на примена за евалуација се избрани внатрешни упатства на лекови од групите J –антиинфективни лекови за системска примена, N-нервен систем и C-кардиоваскуларен систем според АТС класификацијата.

РЕЗУЛТАТИ

Добиените резултати од спроведената евалуација укажуваат на сеуште недоволна унифицираност и усогласеност на внатрешните упатства со постојаната законска регулатива. Оваа појава е особено воочлива кај внатрешните упатствата од додатоците за исхрана кои се достапни на фармацевтскиот пазар во Р.Македонија и кои имаат мошне значајна примена.

ЛИТЕРАТУРА

- Bogaert M, Vander Stichele R, Kaufman JM, Lefebvre R, (eds). Patient package insert as a source of drug information. Amsterdam: Excerpta Medica; 1989.
- Collier J. Patient-information leaflets and prescriber competence. Lancet 1998;352:1724.
- Newby DA, Hill SR, Barker BJ, Drew AK, Henry DA. Drug information for consumer should it be disease or medication specific? Results of a community survey. Aus NZJ Public health 2001; 25:564-570
- Consumers Association. Patient information. What's the prognosis? Policy report. <http://www.which.net/campaigns/health/patientinformation/index.html>, 2003, accessed 25 November 2005
- Guideline on the readability of the labeland. package leaflet of medicinal products for human use, 12 Januar 2009

SOME ISSUES IN PROCUREMENT OF PHARMACEUTICALS IN MACEDONIA WHOLESALERS' PROSPECTIVE

Marija Gulija

AD Dr. Panovski, Skopje, Macedonia

Regarding pharmaceuticals' market in Macedonia, there are many obstacles and difficulties in procurement procedure, especially from wholesalers' prospective. Those inadequacies need to be reconsidered and revised, because they lead to inappropriate supply to the health institutions and lack of access to essential medicines for the population. The difficulties appear mostly due to the poorly implemented Laws and Regulations, vague unspecified legislation framework and lack of transparency in procurement procedures.

Procurement is completely decentralized and fragmented (Law on Health Insurance 2009) and performed at level of public health institutions. Decentralized segmented procurement leads to fragmentation of the market with differences in prices of same drugs (same INN with same dose, form, even producer). Some public health institutions additionally have difficulties when performing procurement procedures, most often because of lack of adequate technical capacities. Some health institutions procure small quantities, where lower prices can not be obtained. Contracts for procurement impede suppliers regarding supply conditions, distribution and payment. End payment is difficult to be obtained for unfavorable and delayed terms of payment in contracts and low financial capacities of health institutions. This leads to decreased liquidity of wholesalers and continuous financial sponsorship of public health institutions by suppliers. Procurement is further more disrupted by implementation of e-procurement, where tendering is on-line. On-line tendering gives opportunity in extremely decreasing the prices of some drugs (dumping prices), where prequalification of suppliers is not performed in advance. This can lead to poor quality in supply and distribution of tendered items. Differences in tender prices of same drugs diminish the concept of reference prices in hospital sector, which is completely not functional. Thus, segregation of the market appears to be leading cause for lack of adequate pharmaceuticals in hospitals, especially when new therapeutic approaches are considered, or specific expensive drugs or sole source providers. Leading problem remains to be the "gray zone" of specific expensive drugs for hospital use.

Pharmaceutical market needs to be regulated coordinately and adequately, with appropriate transparency of the procurement

processes. That is the option for attracting new companies with new drugs, which gives opportunity for assessing and implementing new therapeutic approaches. Variety of drugs offered on market can enable appropriate, adequate and effective access to relevant drugs for the population.

НЕКОИ ПРАШАЊА ПОВРЗАНИ СО НАБАВКИТЕ НА ЛЕКОВИТЕ ВО МАКЕДИНИЈА, ВЕЛЕДРОГЕРИСКА ПЕРСПЕКТИВА

Марија Гулија

АД „Д-р Пановски“, Скопје, Македонија

Постојат многу пречки и потешкотии во процедурата на набавка на лековите, посебно од гледиште на веледрогериското работење, а кои се однесуваат на фармацевтскиот пазар во Македонија. Овие несоодветности треба повторно да се разгледаат и ревидираат, бидејќи водат до несоодветно снабдување на здравствените установи и намалена достапност до есенцијални лекови за населението. Најчесто потешкотиите се јавуваат како резултат на слабата имплементација на законите и правилниците, недоволно јасната неспецифична законска рамка и недостатокот на транспарентност во процедурата на набавка.

Набавките се целосно децентрализираны и фрагментирани (Закон за здравствено осигурување, 2009) и се изведуваат на ниво на јавните здравствени установи. Децентрализираните сегментирани набавки водат до фрагментирање на пазарот, со појава на разлики во цените на исти лекови (ист INN со иста доза, форма, дури и производител). Некои јавни здравствени установи имаат дополнителни потешкотии при изведбата на процедурата на набавка, најчесто заради недостаток на соодветни технички капацитети. Некои здравствени установи набавуваат мали количини, при што не можат да постигнат пониски цени. Договорите за набавување ги ставаат добавувачите во неповолна положба, во однос на условите за набавување, дистрибуција и плаќање. Тешко се постигнува крајна исплата заради неповолните и одложени услови за плаќање поставени во договорите, како и ниските финансиски капацитети на здравствените установи. Ова води до намалена ликвидност на веледрогерите и континуирано финансиско спонзорирање на јавните здравствени установи од страна на добавувачите. Натаму, набавувањето е дополнително нарушено со воведувањето на е-набавувањето, каде тендерирањето се одвова on-line. Тендерирањето on-line овозможува екстремно намалување на цените на некои лекови (дампинг цени), при што не се врши однапред преквалификација на добавувачот. Ова може да води до слаб квалитет на добавување и дистрибуција на тендерираните производи. Разликите на тендерските цени на исти лекови го поткопуваат концептот на референтни цени на лековите од болничкиот сектор, кој целосно е нефункционален. Затоа се смета дека водечката причина за недостатокот од лекови во болниците претставува сегрегацијата на пазарот, особено при употребата на нови тераписки пристапи во лекувањето, употреба на специфични скапи лекови или лекови од единствени добавувачи. Дополнително водечки проблем останува „сивата зона“ на специ-

фични скапи лекови за болничка употреба.

Фармацевтскиот пазар треба да биде регулиран координирано и соодветно, со соодветна транспарентност на процесот на набавка на лековите. Тоа е опција за привлекување на нови компании и нови лекови, која нуди можност за достапност до и имплементација на нови тераписки пристапи. Различноста на лековите кои се нудат на пазарот овозможува соодветен и ефикасен пристап до релевантни лекови за населението.

EVALUATION OF PATIENT FROM DIFFERENT AGED GROUPS ABOUT THEIR SATISFACTION WITH PHARMACEUTICAL COMMUNITY SERVICES IN R. MACEDONIA

Sterjev Z., Vlaco B., Nestorovska K.A., Naumoska Z., Grozdanova A., Suturkova Lj.

National Drug Information Center, Faculty of Pharmacy, University St. Cyril and Methodius – Skopje, R. Macedonia

INTRODUCTION

The mission of pharmacy is to provide pharmaceutical care, defined as “the responsible provision of drug therapy for the purpose of achieving specific outcomes that improve a patient's quality of life”. Development of competences in pharmacy is a basic prerequisite for providing pharmacy care and being responsible for patient treatment outcomes.

The aim of this study was to evaluate levels of patients' satisfaction with pharmaceutical service taking into consideration the different age groups (16-34 aged old, 35-54 aged old and older than 55 years).

METHODS

Two month's cross-sectional descriptive study based on interview data was carried out in order to establish patients' satisfaction with the cumulative quality of pharmaceutical service in R.Macedonia based on their experience.

The eligible, randomly selected 653 patients, on voluntary and confidential basis, were interviewed in front of /inside community pharmacies in R.Macedonia

Statistical analysis was done using Statistica for Windows 8,0.

RESULTS

The highest percentage of patients from the aged group from 16-34 years old and from 35-54 aged old are, usually go to the pharmacy to take drugs for themselves and for others (36.3% and 43%), while more than 50% of respondents older than 55 years, precisely 107 (58.5%) usually taking drugs in pharmacy for themselves.

Only 9 (5%) of them did not go to the pharmacy for personal needs. Statistically these differences in the distribution of responses among the three age groups are confirmed as significant ($p < 0.001$).

Pearson Chi-square: 69,41 df=4, p=,000000*

		16-34	35-54	55+	Row
Taking medicines for myself	N	81	65	107	253
	%	28,5%	34,9%	58,5%	
Taking medicines for other person	N	95	39	9	143
	%	33,4%	20,9%	4,9%	
Taking medicines for myself and for other person	N	103	80	67	250
	%	36,3%	43,1%	36,6%	
Other reason	N	5	2	0	7
	%	1,8%	1,1%	0%	
Column		284	186	183	653

Table 1. Distribution of the answers about reason for going in pharmacy. The choice of pharmacy significantly depends on the age of the respondents. Thus, the proximity of the pharmacy has a higher priority for younger respondents (37.7%), while those aged from 35 to 54 years and older than 55 years, the price of drugs had more influence in choosing a pharmacy (18.8% and 18.1%). Also important for the younger population is how well pharmacy is supply. In terms of combinations of the offered answers, the oldest, over 55 years old more frequently than the other two analyzed age groups had priorities of how near the pharmacy is, but also the price of drugs. It is interesting in this survey that expert advice of employees is equally important in choosing a pharmacy for all ages.

The highest percentage of patients from the oldest group (>55 y.o) answered that they take their necessary medicines from the same pharmacy, if they are available. This comment has been tested due to the difference in the distribution of responses to the three age groups of respondents, when they were asked "Do you take your medicine always in the same pharmacy," Table 2.

Table 2. Differences in the answers to the question "Do you take your medicines from the same pharmacy?" among the respondents from different aged groups

Pearson Chi-square: 42,77 df=4, p=,000000

Are you take your medicines from same pharmacy		16-34y	35-54y	55+	Row
Always	N	41	23	59	123
	%	14,4%	12,4%	32,3%	
Yes, if they are available	N	116	98	82	296
	%	40,8%	52,7%	44,8%	
No	N	127	65	42	234
	%	44,8%	34,9%	22,9%	
Column		284	186	183	653

The ability to talk to an expert in the pharmacy without someone to listen other private conversation, participants from 16 to 34 years old assessed with an average grade $2,5 \pm 1,4$, respondents from 35 to 54 years old with an average grade of $2,7 \pm 1,4$, while older than 55 years gave an average grade of $3,7 \pm 1,5$. These lower rated than other parameters indicate that privacy which pharmacy offers to the client is low. Statistical analysis between the three age groups showed that the respondents older than 55 years, statistically significant higher assessed the possibility to discuss with professional pharmacy without the presence of others, compared to respondents from age group from 16 to 34 and from 35 to 54 years. Table 3.

Kruskal-Wallis test: $H(2, N=638) = 15,15 p = 0005$

Aged group	Valid N	Mean	Std. Dev.	Median	Mode
16 - 34y	276	2,5	1,4	2,0	1,0
35 - 54 y	180	2,7	1,4	2,0	4,0
55 +	175	3,7	1,5	3,0	5,0

Table 3. The possibility of having private conversation with a professional staff member in the pharmacy according to different regions. Tested differences between the three age groups are statistically highly significant ($p < 0.01$), in terms of their general impressions of the employee in the pharmacy, the impressions they have from information given by the employee, the cost of medication and participation of the Health Insurance Fund in the total cost the drugs.

ЕВАЛУАЦИЈА НА САТИСФАКЦИЈАТА НА РАЗЛИЧНИ ВОЗРАСНИ ГРУПИ НА ПАЦИЕНТИ ЗА КВАЛИТЕТОТ НА ФАРМАЦЕВТСКИОТ СЕРВИС ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

Стерјев.З, Влачо.Б, Несторовска.КА, Наумоска.З,
Грозданова.А, Шутуркова. Љ

Национален Фармакоинформативен Центар, Универзитет Св. Кирил
и Методиј-Скопје, Р.Македонија

ВОВЕД

Главната цел на фармацевтскиот сервис е преку оптимално управување со терапијата со лекови да се овозможи највисоко можно ниво на функционална и психо-социјална благосостојба на пациентите. Развој на компетенции во аптека е основен предуслов за обезбедување соодветна фармацевтска грижа која крајно подразбира одговорност кон постигнатите резултатите од третманот.

Целта на ова истражување е да се изврши евалуација на квалитетот на услугите, кои пациентите ги добиваат во аптеките на територијата на Република Македонија.

МЕТОДИ

Спроведена е вкрстена дескриптивна студија која се базира на интервјуа со пациенти со цел да се определи нивната сатисфакција со квалитетот на фармацевтскиот сервис во Република Македонија. Во оваа студија беа вклучени 653 испитаници, односно пациенти, кои при својата посета на аптека доброволно пополнуваа анкетен прашалник, специјално дизајниран за потребата на ова истражување. Податоците од анкетните прашалници се анализирани и обработени во статистичкиот програм Statistica for Windows 8,0. Во студијата се оценува услугата која пациентите ја добиваат во аптека, во зависност од нивната припадност на една од трите возрасни групи (16-34 години, 35-54 години, и постари од 55 години). Испитаниците од возрасните групи од 16 до 34 години, и од 35 до 54 години, најчесто одат во аптека за да земат лекови и за себе и за друг (36,3% и 43%), додека повеќе од 50% испитаници постари од 55 години, поточно 107(58.5%) најчесто во аптека земаат лекови за себе. Само 9(5%) од нив аптеката не ја посетуваат за лични потреби. Статистички овие разлики во дистрибуцијата на одговорите кај трите возрасни групи се потврдуваат како сигнификантни, односно значајни ($p < 0.001$).

Pearson Chi-square: 69,41 df=4, p=,000000*

Која е причината за Вашата посета на аптека		16-34г	35-54г	55+	ред
Да земам лекови за мене	N	81	65	107	253
	%	28,5%	34,9%	58,5%	
Да земам лекови за друг	N	95	39	9	143
	%	33,4%	20,9%	4,9%	
Да земам лекови за мене и за друг	N	103	80	67	250
	%	36,3%	43,1%	36,6%	
Друга причина	N	5	2	0	7
	%	1,8%	1,1%	0%	
колонна		284	186	183	653

Табела 1.

Изборот на аптеката значајно зависи од возраста на испитаниците. Така, близината на аптеката има поголем приоритет за помладите испитаници (37.7%), додека кај оние на возраст од 35 до 54 години, и постари од 55 години цената на лековите повеќе влијае во изборот на аптеката (18.8% и 18.1%). Исто така значајно за помладата популација е и снабденоста на аптеката. Во однос на комбинациите на понудените одговори, најстарите, над 55 години многу почесто од двете други анализирани возрасни групи како приоритети ги земаат близината на аптеката, но и цената на лековите. Интересен е податокот од истражувањето дека стручните совети на вработените се подеднакво значајни во изборот на аптеката за сите возрасти.

Испитаниците постари од 55 години статистички сигнификантно почесто од останатите “се врзуваат” за една иста аптека и во неа секогаш ги купуваат потребните лекаства. Овој коментар е резултат на тестираната разлика во дистрибуцијата на одговорите на трите возрасни групи испитаници, на прашањето “дали Вашите лекови ги земате секогаш во иста аптека” Табела 2.

Pearson Chi-square: 42,77 df=4, p=000000					
Дали Вашите лекови ги земате секогаш од иста аптека		16-34г	35-54г	55+	ред
Секогаш	N	41	23	59	123
	%	14,4%	12,4%	32,3%	
Да, доволку ги има лековите кои ми требаат	N	116	98	82	296
	%	40,8%	52,7%	44,8%	
Не, немам "твоја аптека"	N	127	65	42	234
	%	44,8%	34,9%	22,9%	
вкупно		284	186	183	653

Табела 2.

Можноста да се разговара со стручно лице во аптека без притоа некој да го слуша разговорот испитаниците од 16 до 34 години ја оцениле со просечна оцена $2,5 \pm 1,4$, испитаниците од 35 до 54 години со просечна оцена од $2,7 \pm 1,4$, додека постаите од 55 години дале просечна оцена од $3,7 \pm 1,5$. Овие пониски оцени од другите параметри укажуваат дека приватноста која аптеката ја нуди на клиентот е на ниско ниво. Статистичката анализа меѓу трите возрастни групи покажа дека испитаниците на возраст над 55 години статистички сигнификантно повисоко ја оцениле можноста да разговараат во аптека со стручно лице без присуство на други лица, споредено со испитаниците на возраст од 16 до 34 и од 35 до 54 години. Табела 3

Kruskal-Wallis test: H (2, N= 638) =15,15 p =0005					
Возрасни групи	Valid N	Mean	Std. Dev	Median	Mode
16 – 34 години	276	2,5	1,4	2,0	1,0
35 – 54 години	180	2,7	1,4	2,0	4,0
55+	175	3,7	1,5	3,0	5,0

Табела 3. "Оценете ја можноста да разговарате со стручно лице без притоа некој да го слуша разговорот"

Тестираните разлики меѓу трите возрастни групи се статистички високо сигнификантни ($p < 0.01$) и во однос на нивните генерални впечатоци за вработениот во аптеката, впечатоците кои ги имаат за информациите дадени од вработениот, цената на лековите и партиципирањето на Фондот за Здравствено Осигурување во вкупната цена на лекот.

THE IMPORTANCE OF BRAILLE ALPHABET APPLICATION ON DRUGS PACKAGING

Qendro Gentiana¹, Malaj Ledjan², Hoti Ela³

¹University "Kristal", Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, Tirana-Albania.

²University of Tirana, Faculty of Medicine, Department of Pharmacy, Tirana-Albania

³University of Tirana, Faculty of Medicine, Department of Pharmacy, Tirana-Albania

INTRODUCTION

Packaging form and the information written on the box play a significant role to the confident use of medicament.

In most cases, packaging is designed for patients who do not have problems with eyes. In this study is pointed out the importance of applying braille alphabet on package of drugs analyzing the health consequences caused by difficulties the blind people encounter in using the right drug at a certain time.

METHOD

A group of people of various ages, sick or not, who have the blind status, answered to a questionnaire about several basic problems we had ascertained in our everyday work. The survey was addressed to 500 blind people. It was a direct canvass. The questionnaire was for the inhabitants of Tirana mainly because extending it in other cities of the country came across subjective barriers.

The study included 600 native and imported drugs. Their exterior packages got analyzed if they contained any use explanation in braille writing or not. No selection of medicaments or producing pharmaceutical companies was applied. A selection was made only among the persons with blind status basing on the fact that the questionnaire would be made only with them who knew braille alphabet. The persons who did not know braille alphabet at all and children under school age were left out of this questionnaire, as they had no possibility to read the name of drug. A simple test was made with canvassed people who accepted to collaborate, placing before them some drugs which had the same form and size and beside them some packages of drugs which had the title of drugs written in braille alphabet. At this stage of survey, a selection of drugs which had a frequent use was made. It was seen that they were surer to use the drugs which had their names written in braille alphabet upon.

RESULTS

In Albania 10500 citizens have the blind status, 6300 of them are above 60 years old, 1050 are between 0 month - 25 years old, 400 are with higher education, 1000 with secondary education. From them 2010 blind persons know the braille alphabet. After statistic processing of results we concluded that: 320 blinds had difficulties in finding the name of drug by simply touching, 135 were chronic patients or patients who suffer from other diagnosis, 438 had to ask for the help of their family or friends, 450 were consumers of more than one medicament, 110 had undergone troubles at least once by using the wrong drug. From 600 drugs taken in survey, 420 of them did not have their commercial names written in braille alphabet.

CONCLUSIONS

Application of braille writing on exterior of drugs' packages is a necessity for all producers. In these cases, EU Directive finds the application for using this sort of writing helping this way that category of people who keep the

status of a blind person and at the same time their health goes under protection. This will lead to reduce the incidence of toxemia from confusing drugs one with another during their use.

REFERENCES

- Directive 2004/27/EC of the European Parliament
Directive 2001/83/ of the European Council (amending)
Law Nr. 9323 dated, 25.11.2004 "Medicines and health servis in Albania"
Law Nr. 9902 dated 17.04.2008 " The protection of consumers".

THE ROLE OF PHARMACISTS IN DECREASING ANTIMICROBIAL RESISTANCE

Marija Nadazdin, Lela Radakovic, Martika Ivkovic

Pharmacy Bor

INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) dedicated this year's Health Day to antimicrobial resistance with a message- "No action today, no cure tomorrow". Antimicrobial Resistance (AMR) is the resistance of microorganisms to antibiotic medicines to which the microorganisms were previously sensitive to. Antimicrobial resistance risks our control of infectious disease, threatens our return to an era before the discovery of antibiotic medicine, and increases spending for health care. This is the consequence of use, especially misuse, of antimicrobial medicine. Since pharmacists at public pharmacies are the most available health workers to the general public, this slogan for action calls us to prove our readiness in being the strongest link in promoting health, educating the population, and showing correct use of medicine--all which fits with the profile of a modern pharmacist.

OBJECTIVES

The objective of this work is to introduce consumers who come to the pharmacy with the concept of antimicrobial resistance (AMR), research their behavior before the use of antibiotic medicine and--according to the results of the research--plan out our future activities.

METHOD

In 3 federal pharmacies in Bor's counties (Federal Pharmacy of Majdanpek, Pharmacy of Donji Milanovac, Pharmacy II Kilometar Bor) adult users, who were chosen by a random method on 07.04.2011, were given educational materials and a questionnaire with 10 questions about their experience in using oral antibiotics and their knowledge of AMR. 173 brochures and questionnaires were distributed and a total of 106 which were completely filled out were returned to us.

RESULTS

From the 106 questionnaires that were collected, 21 were done in Bor, 37 in Donji Milanovac, and 48 in Majdanpek. The average age of the participants in our study was 43-64 years old (ages ranged from 18-77). The majority of those questioned were female (64.00%) and high school graduates. The questions were separated into 3 segments- behavior of participants with symptoms of infection, use of antibiotics, and resistance to antibiotics. When they have symptoms of infection, the pharmacy is the first stop of the patients (47.17%) and then their chosen doctor (42.45%). When customers come to the pharmacy with symptoms most have faith in what their pharmacist recommends (66.99%) others self-medicate with antibiotics (29.13%) and an even

smaller percentage (3.88%) rely on information from television commercials. A quarter of those questioned do not use antibiotics without the direction of a doctor, 64.15% say they don't often use antibiotics without doctors' direction, and 10.38% say they often use unprescribed antibiotics. A majority of those questioned (59.05%) report to taking the prescribed antibiotics until the end of the therapy while 22.89% used the antibiotic until the end of their first symptoms. A third of clients questioned (32.10%) did not know about antimicrobial resistance while a half (52.80%) were familiar with this concept. Almost all (90%) were interested in increasing their knowledge of this area. Out of the 56 participants who claimed to know what antimicrobial resistance was 46 did not prove that knowledge through correct use of antibiotics. Out of 50 participants who were not sure or did not know what antimicrobial resistance was 47 were not using antibiotics correctly. Thus according to our study, out of 106 participants, 93 needed further advice--which could be given by their pharmacist--on utilizing antibiotics and decreasing their chances of antimicrobial resistance.

In light of the special role that parents play in the development of their children--both in their responsibility for the welfare of their child as well as their role in health education for their child--the last question in the questionnaire was, "Do you give your children antibiotics without a prescription?" The disturbing statistic was that almost a fourth of parents questioned give their children antibiotics without a prescription--4.35% do it often and 18.84% do it from time to time.

CONCLUSION

Activities that were put into action due to the World Health Day show that there is a need, and a want, from consumers, as well as pharmacists, for both sides to take part in furthering education, improving compliance to health rules and changing current behaviors. The conclusions reached through these questionnaires have shown us incomplete knowledge on the part of the patient about correct use of oral antibiotics as well as antimicrobial resistance. We must keep in mind that 80% of all antibiotics that are used in human medicine are taken outside of hospital environments thus pharmacists in a pharmacy find themselves in an ideal position to cut down the number of mistakes made by consumers (self-prescribing themselves certain medicine, correct dosing, and the duration of their therapy). Knowledge and skills that pharmacists possess can be utilized to minimize the causes of antimicrobial resistance. The fact that patients come to pharmacists first is a sign that we must organize for further action. Antimicrobial resistance is a global problem. The statistic from the United States, which tells us that 63% of adult patients with acute respiratory problems take antibiotics but that in 55% of cases the antibiotics are resistant, shows us that the solution to the problem of antimicrobial resistance requires a more active team effort from pharmacists and primary care physicians. Collectively responsible attitudes towards health in society are developed early in life and educating parents today is a requirement towards reducing the spread of antimicrobial resistance tomorrow. Our next step is to conduct workshops on antimicrobial resistance in cooperation with the employees of the Educational Institution "Marija Muncan" as well as the parents whose children attend kindergarten at the school.

REFERENCES

- WHO - World health day, available from <http://www.who.int/world-health-day/2011/en/index.html>, cited 20.04.2011.
WHO/97, *Seven stars Pharmacist*, FIP, Resolution, 58. Congress, Haag, 1998
<http://www.fip.org>, cited 20.04.2011.
<http://www.zavodzajecar.org>, cited 20.04.2011.

Steinman MA, Landefeld CS, Gonzales R: Predictors of broad-spectrum antibiotic prescribing for acute respiratory tract infections in adult primary care. *JAMA* 289:719-725, 2003

Milica Prostran: Rational use of antibiotics: Algorithms in Respiratory Infections, Available from <http://www.med.bg.ac.rs/dloads/studenti/2010/januar/farma/todorovic/prof Prostran, 2009antibiotici racionalna primena.pdf>, cited 20.04.2011

Branislava R. Miljkovic: From compliance to concordance. 3rd International conference Marketing in pharmacy, Belgrade, Serbia, 2010-32

E-MARKETING – NEW ROUTES TO APPROACH PHYSICIANS AND PATIENTS

Hristina Lebanova, D.K. Manolov, I. N. Getov

Medical University – Sofia, Faculty of Pharmacy

INTRODUCTION

In 2001 Bill Gates called this new decade "The Digital Decade" and this is a fact now. Online technologies and applications have enabled consumers to communicate their personal experiences with companies' products and services to other consumers. Increased internet usage over the last years is clear sign that Pharma industry has to evolve. Improving public perception and exploring other communication avenues is necessary if Pharma is to keep in touch with its customer base.

AIM

The purpose of this study is to outline trends and the new routes to approach doctors and patients by the pharmaceutical industry.

MATERIAL AND METHODS

The data is Delphi method to evaluate publications for the period 2005-2011 on the topic of "Internet pharmaceutical market" and "e-Marketing". We also reviewed available related articles in Internet and analyzed more than 70 studies, articles and scientific publication.

The data and conclusions are included in the study.

RESULTS

Over the last 15 years Internet users has grown from 16 million (0.4% of the population) to 1.966 billion (29% of the total population). In 2009 consumers spend 34% of their media time online. As a result, digital marketing spending has gone from \$6.2 billion in 1999 to \$25.6 billion, or 12% of all marketing costs in 2009. As health is one of the most searched topics in Internet, physicians have to keep up with the ever more informed patients. In US 86% of physicians use the Internet to gather health, medical or prescription drug information. The share of physicians who use the Internet for health information is 92%. Main part of medical doctors access Internet from their office. Another popular way of collecting professional information is by online videos. Nearly half of online active physicians in Western Europe watch online video for professional purposes, jumping from only 28% in 2006 to 46% in 2009.

DISCUSSION

Physician's use of the Internet continues to surge. The Internet is reinventing medicine, healthcare delivery and physician communication. This trend is a clear sign that Internet should be a major pillar in the future marketing campaigns of any pharmaceutical company. The target audience – physicians and patients are already there, searching for information and ensure additional promotional

channel for the marketers. Most of the pharmaceutical companies came relatively late on the internet, but the last few years, show that this is changing, although not as fast as in other industries. A Washington Post article of June 16, 2009 reported that an increasing number of pharmaceutical companies are turning to social media tools, such as Facebook, YouTube, Twitter and MySpace, to market their products. The pharmaceutical industry spent more than \$1 billion on Internet ads in 2008 and is projected to spend \$1.7 billion on such marketing efforts in 2012, according to the Direct Marketing Association. The top 10 drug companies using social media are Pfizer, Johnson and Johnson, Novartis, Boehringer Ingelheim, AstraZeneca US, Bayer, GlaxoSmithKline, Sanofi-Aventis, Roche and Merck.

CONCLUSION

The online marketing is becoming an integral component of marketing strategies for most big Pharma companies. Knowledge and insights gained from on-line communication with physicians and patients could be valuable for feedback and customer loyalty assessment. E-Marketing for pharmaceuticals is an area where national regulators are a few steps behind. The actual legislation and requirements are still to be defined.

REFERENCES

- Internet growth statistics (2011) <http://www.allaboutmarketresearch.com/internet.htm>
- What you can learn from consumers' digital decade, J. Bernoff, 2009 <http://forrester.typepad.com/groundswell/2009/12/what-you-can-learn-from-consumers-digital-ecade.html>
- eHealth for the Pharmaceutical Industry BFHC0747/Published 01/2007
- 86% of physicians use Internet to access health information, P.L. Dolan, 2010 <http://www.ama-assn.org/amednews/2010/01/04/bisc0104.htm>
- Webinar Deck, Connecting with Physicians Online <http://www.fdsasm.com/docs/Connecting%20with%20Physicians%20Online%20Webinar%20Deck-%20final.pdf>
- Reaching Doctors and Patients Through New Digital Media DMHC2368
- Google Trends (2007). Available from <http://www.google.com/trends>
- Internet World Stats (2006). Available from <http://www.internetworldstats.com/>
- Madden, M. (2006) Internet Penetration and Impact. *Pew Internet & American Life Project* [Internet], April 26. Available from: http://www.pewinternet.org/PPF/r/182/report_display.asp
- Datamonitor eHealth Physician Insight Survey 2005*, BFHC0747, 01/2007 survey.isoc.bg/ [Accessed from November 3, 2010].
- Datamonitor, Business Blogging for Фармацевтичната индустрија, DMHC2331, 08/2007
- John Estafanous (2007), Physician's use of the Internet continues to surge http://blogs.estcommedical.com/medical_marketing/2005/07/physicians_use_.html [Accessed from November 3, 2010]
- Datamonitor, Фармацевтичната индустрија Vitae 2009: Merck & Co. Inc, CSHC1410, March 2009.
- Проучване измерва пулса на електронното здравно обслужване (e-Health) в Европа и предписва по-широко използване на ИКТ от лекарите, IP/08/641, 25/04/2008 http://ec.europa.eu/information_society/europe/i2010/benchmarking/index_en.htm [Accessed from November 3, 2010].
- Half of European doctors use web video, J. Hoeksma, 2010 http://www.ehi.co.uk/news/EHI/5552/half_of_european_doctors_use_web_video
- Pharma's Drug Ads, 2009 <http://www.cchrint.org/2009/11/16/pharmas-1-7-billion-internet-marketing-pipeline/>

BLOOD PRESSURE CONTROL IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE II

Roland Antoni¹, Sandra Vezmar-Kovačević², Snežana Lukić¹

¹Community Pharmacy „Šabac“, Šabac, Serbia
Department for Pharmacokinetics and ²Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Belgrade, Serbia

INTRODUCTION AND AIM

The presence of arterial hypertension in patients with diabetes mellitus type II (DM II) significantly increases the risk of macrovascular and microvascular complications as well as the risk of death from cardiovascular disease. Target blood pressure (BP) value in patients with DM II is <130/80 mm Hg. The **aim** of this research was to investigate BP control in patients with DM II, and the presence of risk factors that might affect the increase in BP such as smoking, body weight and increased lipid levels.

METHODOLOGY

In the research performed in Pharmacy „Šabac“, 140 patients with DM II were randomly selected. Data was collected about drugs use and risk factors for hypertension, as well as demographic data. BP was measured and documented.

RESULTS

Average age of patients was 65 years (24-84). Average systolic BP was 146 mm Hg (100-200 mm Hg). Average diastolic BP was 87 mm Hg (70-120 mm Hg). Only 27,14% of patients achieved adequate control of BP with prescribed therapy. 1,43% of patients did not have hypertension. 5,72% of patients were without antihypertensive therapy although they had increased BP. 75,71% of patients had one risk factor that significantly affected the increase in BP, 7,86% had 3 risk factors. 18,57% were smokers, 49,26% were overweight and 50,71% had increased lipid levels. 30,44% had one drug in the treatment, 31,88% two drugs and 37,68% three or more drugs.

CONCLUSION

Our results indicate that overall, patients with DM II do not have satisfactory BP control. The majority of patients had at least one risk factor which could have contributed to the poor BP control. Moreover, the reasons for poor BP control may be inadequacy of treatment and/or poor compliance. Since BP control is essential for lowering the mortality rate of patients with DM II, they may benefit from pharmacist-provided education on smoking cessation, body-weight and lipid level lowering. Moreover, understanding the influence of risk factors and the need for BP control may influence patient's compliance to treatment. Therefore, pharmacists should pay particular attention to the education of patients with DM II about BP control.

REFERENCES

- National clinical practice guidelines for diabetes.2002.
- National clinical practise guidelines for arterial hypertension.2005.

RATIONAL ANTIBIOTIC THERAPY: WHAT DO OUR PATIENTS KNOW?

Milica Pešić¹, Roland Antoni², Gorana Krstić¹, Gordana Stanisavljević¹, Snežana Mitić¹

¹Community Pharmacy „Vranje“, Vranje, Serbia
²Community Pharmacy „Šabac“, Šabac, Serbia

INTRODUCTION AND AIM

Irrational use of antibiotics leads to the development of multi-resistant strains of bacteria and is a serious problem of global importance. The aim of this research was to examine how well patients are informed about the importance of rational use of antibiotics.

METHODOLOGY

In the research performed at the Pharmacy „Vranje“, and „Šabac“ 103 patients aged 19 to 72 were randomly selected. Data was collected by answering a questionnaire.

RESULTS

77.7% of respondents use antibiotics without a doctor's recommendation. 26.2% of them think that there is no need to go to the doctor because they know which antibiotic will help them for certain symptoms, while 73.8% take antibiotics self-initiatively when there is no time to go to the doctor. 72.5% of respondents use antibiotics without a doctor's recommendation less than 3 times a year, 7.5% 3 to 5 times, 5% more than 5 times a year, 15% whenever they think it is necessary.

3.9% of total number of respondents think that self-initiative usage of antibiotics is harmless, 64.1% that it represents danger to the individual who uses antibiotics without recommendation and 17.5% know that irrational use of antibiotics is a threat to the whole society. 17.5% of respondents think that the antibiotic that has helped them before would be as effective in any further cases when the same symptoms occur.

72.8% of respondents obey the recommended dosage regimen of antibiotics, while 10.7% know that they should be compliant with the dosing regimen, although it isn't always the case.

75.7% use antibiotics for as long as the doctor has advised them, while 2,9% use antibiotics until they feel better and then they stop the treatment.

1.9% do not comply with physician's advice.

CONCLUSION

Patients' knowledge about rational use of antibiotics is not satisfactory. They are not aware of the importance of respecting dose regimen and duration of antibiotic therapy for therapeutic results and preventing development of resistant strains of bacteria. Pharmacists as the most available health workers should take an active role in educating patients about this health issue of global importance.

REFERENCES

- Selection and use of antibiotics in general practice / (Compiled by Task Force for guide, leader Slobodan Janković). - 1 ed. - Belgrade: Medical Faculty; University of Belgrade, CIBID, 2004

IDENTIFICATION OF MEDICAL NEEDS FROM PRIMARY HEALTH CARE DATABASES IN ALBANIA

N. Kellici¹, M. Fida¹, A. Dibra², M. Miraci², S. Kellici²

¹Primary Health Care Service, Tirana, Albania

²University of Tirana, Faculty of Medicine, Tirana, Albania

INTRODUCTION

The primary health care system in Albania started its reform since 1991, date of the political system change. During all these years of long and difficult transition this system performed a continuous modification and actually we can say that it reached some stability. The primary health care unit nr 8 in Tirana offers health service today to 59224 patients. Year by year the number of insured people is growing and their need for health services is changing, too. This implies the need for performance improvement of the primary health care system.

OBJECTIVES

We tried to investigate the trend of the patients' needs for health care services based on our databases and our experience of the last 4 years of work.

METHODS

We searched through our databases of the last four years and found the number of patients receiving health services, what kind of service they need, which are the pathologic changes in these years etc.

RESULTS

By 59224 patients registered at primary health care unit nr. 8, 8592 are patients suffering of chronic diseases and are in treatment for these diseases.

We noticed that year by year there is a significantly rising in the number of chronic diseases treated compared to the number of acute conditions treated.

The number of patients that requested health care service at our center increased slowly each of these four years from 96651 visits in 2007 to 118302 visits in 2010. This increase in the number of medical visits is not only dedicated to the greater number of registered patients, but especially to the raise of awareness among patients related to their medical needs. By this point of view we can say that the number of meetings of every single patients with his/her doctor was increased significantly.

The specialistic meetings increased as well especially these of cardiology, laboratory tests, gynecology etc. The most influenced among the specialistic meetings was the number of cardiologic meetings with an increase from 4060 visits in 2007 to 5619 visits in 2010. The laboratory tests were increased from 3900 tests in 2007 at 7310 tests in 2010. There is a stability in the pediatric number of visits in these years.

CONCLUSIONS

There is an increased tendency of the Albanian patients to benefit from the primary health care services. The insured persons are rising in number and this is due to many factors: health care reform, more medical needs, raising awareness on health care issues etc.

The pathological spectrum is in continuous change due to a changed

life style, to the increase of the average age etc. Patients are more oriented now to the laboratory findings than they were four years ago. The continuous monitoring of the number of patients, number of medical visits, type of visits (thus type of medical needs) will absolutely help us to better understand the health status of our community and to better explain the factors that might have any eventual impact on it. For sure we must further investigate many other factors that can influence the health status of our patients (life style, smoke, ambient contamination etc.).

These findings will help us and the health care decision makers to better orient the health education strategies and health promotion interventions.

REFERENCES

- Alvaro Zerda et al; Health insurance systems and access to medicines; Washington D.C. (2002).
- Besim Nuri, European Observatory on health care systems (Albania), Health care systems in transition. (2002)
- Elias Mossialos, Monique Mrazek, Tom Walley; Regulating pharmaceuticals in Europe: striving for efficiency, equity and quality. (2004)
- M.N.G. Dukes, F.M. Haaijer-Ruskamp, C.P. de Joncheere, A.H. Rietveld; Drugs and money; prices, affordability and cost-containment.. (2003)



**КЛИНИЧКА БИОХЕМИЈА /
ТОКСИКОЛОГИЈА /
ХРАНА И ИСХРАНА**

орални презентаци

**CLINICAL BIOCHEMISTRY /
TOXICOLOGY /
FOOD AND NUTRITION**

oral presentations

FULLERENOL: MAGIC BULLET OR CELL KILLER

Rade Injac, Borut Štrukelj

Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmaceutical Biology, University of Ljubljana, Askerceva 7, 1000 Ljubljana, Slovenia

Studies on biological properties of fullerene C_{60} and its derivatives started a decade ago as curiosity-driven studies and are now flourishing as an area of transdisciplinary research. Fullerenes are the third pure crystal form of carbon in addition to diamond and graphite. Fullerenes consist of a spherical (C_{60}), ellipsoid (C_{70}), or cylindrical (carbon nanotubes) carbon atoms. They were named after Richard Buckminster Fuller. A spherical fullerene C_{60} looks like a soccer ball and therefore it is often called "buckyball" or "footballene". Robert F. Curl, Jr., Richard E. Smalley, and Sir Harold W. Kroto discovered fullerenes as an unexpected surprise during laser spectroscopy experiments at Rice University in September 1985. The Nobel Prize in Chemistry in 1996 was awarded to this American-English research team for discovery of this molecule with the perfect symmetry existing in nature. Fullerenes C_{60} are polyhedral closed cages made up entirely of n three-coordinate carbon atoms and having 12 pentagon and 20 hexagonal faces. Fullerene C_{60} molecule possesses geometry of truncated icosahedrons fullerene-60- I_h . Diameter of the molecule C_{60} is 0.710 ± 0.007 nm. The outer and inner diameters of p electron cloud can be estimated as 0.340 nm and 0.350 nm respectively, and bond energy per atom is 7.40 eV. Pure fullerenes are black crystals and powder insoluble in water and proton-acceptor solvents. It is soluble in halogen and alkyl-substituted benzene (1,2-dichlorobenzene 27mg/ml). Using combinations of nucleophilic and electrophilic additions, cyclo-additions and radical additions, it is possible to covalently bond any class of organic compounds to a fullerene core. These structural and electronic characteristics of fullerene C_{60} provide possibility for conducting various types of chemical transformations that resulted in a wide variety of biologically active water-soluble fullerenes. Fullerenes derivatives take important place in the development of nano-biotechnology and nano-medicine related products. The chemical modification of fullerene C_{60} molecule by attachment of hydroxyl groups was an easy and straightforward method to synthesis water-soluble fullerenes, named fullerols or fullerlenols ($C_{60}(OH)_n$ $n=2-36$). Structure of fullerlenol $C_{60}(OH)_{24}$ shown in Figure 1. [1-3].

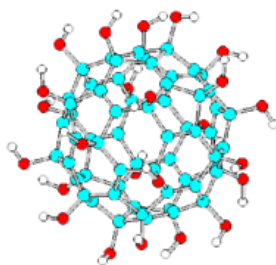


Figure 1. Fullerlenol $C_{60}(OH)_{24}$.

Fullerlenol $C_{60}(OH)_{24}$ has diameter of around 1 nm with symmetrically arranged hydroxyl groups on the C_{60} sphere. Fullerlenol is a dark brown amorphous substance, soluble in water and in DMSO. Fullerlenol can be dissolved in water, in concentration ranging from 10^{-3} mol/dm³ to 5×10^{-3} mol/dm³ and in pH interval from 3.5 to 9.8; it forms nano-aggregates,

with up to 40 presences of aggregates larger than 400 nm (Figure 2).[4]. Fullerlenol may react rapidly and irreversibly with a variety of metal salts under ambient aqueous conditions to produce insoluble metal-hydroxyfullerene cross-linked polymers (M-fullerlenol). Interaction of fullerlenols with bio-metal is important with regards to fullerene-based pharmaceutical agents and waste treatment as well. Several chemical properties of fullerlenols may significantly influence their biological activity. Similar to nonhydroxylated water-soluble fullerene derivatives, the most important characteristics of fullerlenols regarding mechanisms of their biological activity are photosensitizing property and free radical scavenging activity [6-12].

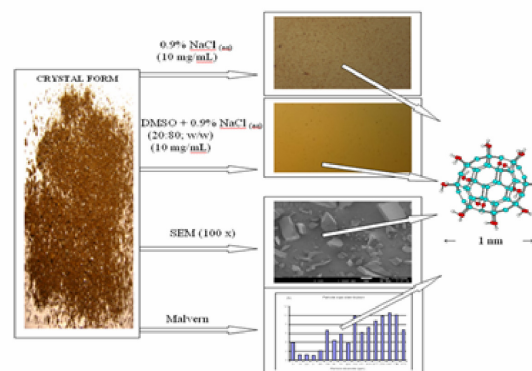


Figure 2. Properties of fullerlenol $C_{60}(OH)_{24}$.

Antioxidative and free radical scavenging activity of fullerlenols are their most exploited properties in biomedical studies. Antiproliferative, and cytotoxic effects of various water-soluble fullerlenol $C_{60}(OH)_n$ have been observed in different experimental models (*in vivo* as well as in *in vitro*).

References

- [1] Injac R, *et al.* Farm Vest 59 (2008) 257.
- [2] Injac & Strukelj, Technol Cancer Res T, 7 (2008) 497.
- [3] Injac R, *et al.* Afr. J. Biotechnol. 25 (2008) 4940.
- [4] Injac *et al.*, Biomaterials, 29 (2008) 3451.
- [5] Injac *et al.*, Tech. Cancer Res. T., 7 (2008) 15.
- [6] Injac *et al.*, Pharm. Rep., 5 (2008) 492.
- [7] Injac *et al.*, Pharm. Rep., 2 (2009) 335.
- [8] Djordjevic-Milic V, *et al.* Mater Sci Forum 518 (2006) 525.
- [9] Djordjevic-Milic V, *et al.* Toxicol Mech Method 19 (2009) 24.
- [10] Injac *et al.* Biomaterials 30 (2009) 1184.
- [11] Injac *et al.*, Hem. Ind., 62 (2008) 197.
- [12] Dragojevic-Simic, *et al.* Dig. J. Nanomater. Bios. 6 (2011) 819.

DERIVATIVE SPECTROPHOTOMETRY IN ENVIRONMENTAL, FOOD AND CLINICAL SAMPLES ANALYSES - EVALUATION OF EP7 MONOGRAPH

K.Karlijkovic-Rajic1, B.Markovic2,

University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, ¹Department of Analytical Chemistry, ²Department of Pharmaceutical Chemistry, Serbia

INTRODUCTION

Derivative spectrophotometry (DS) is one of the advanced modern spectrophotometric techniques (since 2002 official in 4th Ph.Eur.-EP) which consist in the differentiation of zero-order spectra. This technique usually improves: a) resolution of overlapping spectra due to higher separation efficiency as the band is much sharpened; b) eliminates the influence of background or matrix; c) enhances the detectability of minor spectral features (required for trace analyses) and d) provides more defined fingerprints than the conventional UV-Vis spectrophotometry.

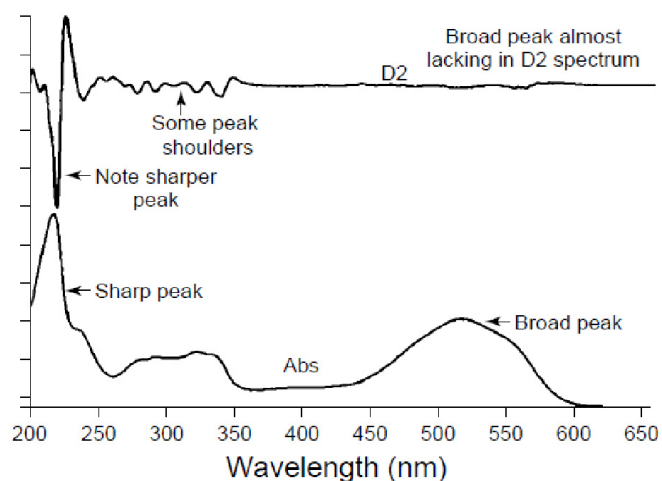


Fig.1. Discrimination against broad bands

Analytical advantage of derivative spectra originates from the fact that the derivative process discriminates in favor of sharp bands and against broad (Fig.1) to an extent that increases with derivative order. Derivative transformations (mainly even derivatives) permit discrimination against broad band interferences arising from turbidity or non-specific matrix absorption and it tends to emphasize subtle spectra features, allowing the enhancement of the sensitivity and specificity in mixture analyses most frequently assayed by zero-crossing-point technique (Fig.2).

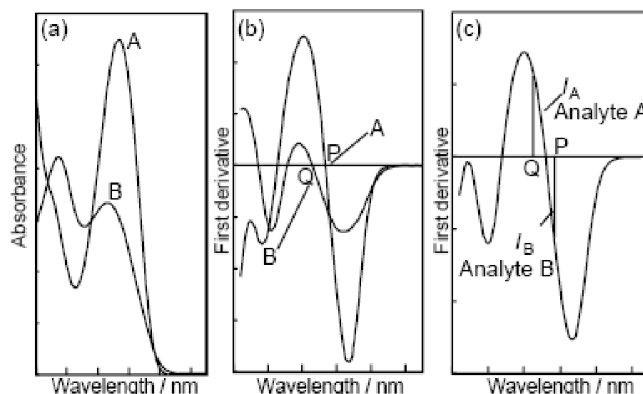


Fig.2. Zero-crossing-point technique for multicomponent analyses

It is worth noting that though higher derivatives appear to improve resolution, the spectra obtained are also significantly distorted by noise. Since 1996 several reviews have been published (1-6).

APPLICATIONS

Within environmental analyses applications of DS will be presented in chemical oxygen demand (COD) analysis as it is often used to reflect the degree of pollution and characterizes pulping effluents, as well as for monitoring of dissolved organic matter (DOM) composition in natural waters and engineered treatment systems using first- through fourth-order derivative absorption spectra. Among the environmental pollutants such as: phenol and mononitrophenol isomers; mixtures of phenols and herbicides (HPLC-DS supporting technique); aromatic amines (HPLC-DS complementary technique); fungicides (thiram-fourth derivative assays); herbicides and pesticides (diquat and paraquat-second derivative, parathion and p-nitrophenol in vegetable tissues) as well as simultaneous determinations of nitrite and nitrate (first- and second-order derivative) have received considerable attention. Textile and other industrial dyes and pigments (emitted into wastewaters) represent an increasing environmental danger thus the DS applications are focused on: determination of dyes contents in bi-component solutions by means of zero-crossing point DS; simultaneous determination of three textile dyes in industrial effluents as well as removal (adsorption) of basic dyes from single and binary component systems.

Different applications of DS in clinical samples analyses in the first period included quantitation of urinary porphyrins; plasma paraquat concentration as an index of severity of poisoning; methemoglobin in blood as well as diverse analyses of amino acids. The relevance of DS assays for antibiotics; trapidil and gemcitabine in urine/plasma samples; drug and corresponding metabolite (naproxen in presence of 6-desmethyl metabolite with importance of an interaction graph); in combination therapy (methotrexate and leucovorin in biological fluids) were established. Clinical samples such as amniotic fluid (analyses of bilirubin, oxyhemoglobin and albumin), human serum (malondialdehyde as widely accepted biomarker of lipid peroxidation in evaluation of oxidative stress), post-haemodialysis fluids (Fe(III)/Al(III)), plasma coenzyme Q₁₀ and partition of drugs into model systems of bio-membranes were considered. In our laboratories direct determination of paracetamol in urine using second-order DS was used for biopharmaceutical characterization of drug products. Lead, cadmium and thallium in clinical samples were evaluated using DS.

In food samples analyses mainly determined compounds are colorants (Tartrazine, Sunset Yellow, Ponceau 4R in various combinations). DS was used to evaluate the efficiency of phenylalanine removal for dietary supplements. Assays for malondialdehyde contents in infant milk formulas, protein and casein in milk as well as RPHPLC-second and fourth DS for milk proteins were evaluated. Applications of DS for the control of lipid oxidation in meats along with effectiveness of carnosine and dietary supplementation with α -tocopherol as well as assay of aromatic acids in cooked meat were outlined. Content of Vitamin C, plant pigments chlorophyll a and b, soy protein isolate, energizers in energy drinks, sorbic and benzoic acids in soft drinks and antibiotics in feeds were investigated using DS.

EVALUATION OF EP7 MONOGRAPH

Within our inter-laboratory evaluation of DS monograph (Ph.Eur.7) the comparison of analogue and digital (Savitzky-Golay algorithm) of second-order derivative spectra was carried out recording spectra on GBC-Cintra 20 (digital – smoothing points 5-21) and Thermo-Scientific - Evolution - 300 (analogue – smoothing – Low, Medium, High and Very-high or digital – smoothing points 3-121) using 0.02% V/V toluene in methanol solution. Requirement for resolution power defined as ratio A/B (A-amplitude ${}^2D_{265,263}$; B-amplitude ${}^2D_{263,261}$) is not less than 0.2 corresponds to resolution of shoulder and peak within the band. The results showed that the only possible comparison of instruments is for smoothing 7, and for both analogue and digital spectra with smoothing 7 and Medium.

IN CONCLUSION, along with substantial advantages of DS the limitations are caused by: a) dependence on instrumental parameters; b) non-robust character of the selected parameters of elaborated methods-parameters can be used only for system for which they are chosen and c) lack of harmonized protocol of parameter's optimization and results presentation.

REFERENCES

1. C.B. Ojeda, F.S. Rojas, J.M.C. Pavon, Talanta 42 (1995) 1195-1214.
2. J. Kapriška, Talanta 64 (2004) 801-822.
3. C.B. Ojeda, F.S. Rojas, Anal. Chim. Acta 518 (2004) 1-24.
4. A.A.Y. El-Sayed, N.A. El-Salem, Anal. Sci. 21 (2005) 595-614.
5. F.S. Royas, C.B. Ojeda, Anal. Chim. Acta 635 (2009) 22-44.
6. K.N. Patel, J.K. Patel, G.C. Rajput, N.B. Rajgor,
7. Der Pharmacia Lettre 2 (2010) 139-150.

VIABILITY OF *L. CASEI* IN SYMBIOTIC CARROT JUICE DURING FERMENTATION AND STORAGE

T. Petreska Ivanovska¹, L. Petrusevska Tozi¹, J. Hadzieva¹, K. Smilkov², N. Geskovski¹, K. Mladenovska¹

¹University "Ss Cyril and Methodius", Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

²University "Goce Delcev", Faculty of Medical Sciences – Pharmacy, Krste Misirkov bb, 2000 Stip, Macedonia

INTRODUCTION

Although dairy products are generally good matrices for the delivery of probiotics to humans and traditionally the most used, fruit juices are of growing interest due to their pleasant taste profile and refreshing characteristics (1). The increased demand of fruit juices for probiotic carriers can be explained by the lack of milk allergens and cholesterol (2). In addition, fruits and vegetables inherently contain essential nutrients such as vitamins, minerals and antioxidants (3). However, the low survival rate of probiotics in fruit juices resulting from acid environment is of concern. The viability of probiotic cells in fruit juices can be improved by adding of microencapsulated cells to the juice. In this study, carrot juice was inoculated with free probiotic cells of *L. casei* and synbiotic microparticles loaded with *L. casei* to compare the survival rate of the probiotic during fermentation and storage of the synbiotic beverages at 4 °C for 6 weeks.

MATERIALS AND METHODS

Carrot juice was prepared by extraction of washed and peeled carrots with no added water or any other nutrient. Then, the juice was pasteurized at 80 °C for 20 min. The cell suspension of probiotic *Lactobacillus casei* (Chr. Hansen, Denmark) was divided into two parts: one part was used for microencapsulation and another was used as free cells for direct adding in carrot juice. Prebiotic fructooligosaccharide (FOS) (Sigma-Aldrich, USA) was added simultaneously with free probiotic cells. The initial cell concentration of $7.4 \pm 0.1 \log_{10}$ cfu/ml was applied to ferment carrot juice using *L. casei* and FOS or synbiotic microparticles. This concentration was chosen according to the recommendations for minimum counts of $7.0 \log_{10}$ cfu per g or ml of probiotic food to exert beneficial effects (4). The microparticles were prepared by modified spray-drying method (5) when aqueous dispersion of alginate (LF 10/60, Protanal, FMC Biopolymers, USA), FOS and *L. casei* was submitted to spray-drying (nozzle diameter 0.7 mm, aspirator pressure 90%, flow rate 6 ml/min, inlet and outlet temperature, 120 °C and 60 °C, Büchi Mini Spray Dryer B-290, SW) followed by subsequent cross-linking and coating in solution of CaCl₂ (Merck, Germany) and chitosan (Chitine, France) in 1% w/w acetic acid. The microparticles formed were cured at least 3 h, separated and freeze-dried (-50 °C, 0.070 mbar, 24 h, Freeze-Dryer, Labconco, USA). An optimal formulation of micro-particles was prepared, with 4% w/w alginate, 0.5% w/w chitosan and 5% w/w CaCl₂. Positively charged microparticles (21.5 ± 1.5 mV) with d_{VS} $9.1 \pm 0.8 \mu\text{m}$, Ca-content of 9.4 ± 0.1 % and high cell viability of *L. casei* ($11.3 \pm 0.15 \log_{10}$ cfu/g) were obtained. Synbiotic microparticles were added to the carrot juice on the same day of preparation. All samples of synbiotic carrot juices were packed into sterile Erlenmeyers flasks closed with cotton plugs. The samples inoculated with free cells and added particles were firstly sub-

mit to fermentation and then stored at 4 °C. The fermentation process was carried out in an incubator for 24 h at 37 °C. The viability of *L. casei* in all experiments was determined periodically during 24 h and then on a weekly basis for 6 weeks of storage. When enumeration of bacteria was performed, 1 ml of the sample was mixed with 9.0 ml of peptone water, vortexed for 15 s and serially diluted with peptone water. The viable count was determined using plate-count method on MRS agar (Merck, Germany) after 72 h of incubation at 37 °C. Regarding the samples with added microparticles, the particles were removed from juice by filtration, washed with sterile saline solution and liquefied with phosphate buffer (pH 6.9). The suspension of particles was vortexed 30 s followed by standing at room temperature and then enumerate as described above. The pH of synbiotic carrot juices were also examined (pH meter PB 11 Sartorius, Germany).

RESULTS AND DISCUSSION

During the fermentation of carrot juice *L. casei* grew rapidly with increased population of free cells compared to encapsulated ones. At the end of the fermentation period the pH value of the juice inoculated with free cells was found to be lower than that of the microparticles added juice (Fig. 1).

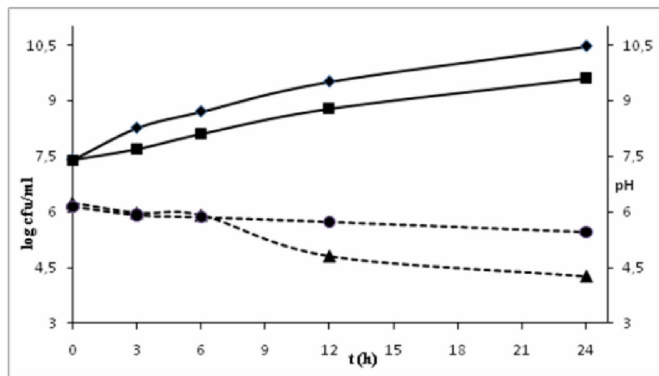


Fig. 1. Changes in viability and pH values during fermentation of carrot juice with free and microencapsulated *L. casei*

The viable cell counts of microencapsulated *L. casei* in fermented carrot juice was $8.1 \pm 0.13 \log_{10}$ cfu/ml after 6 weeks of cold storage at 4 °C, while that of free cells was only $4.89 \pm 0.1 \log_{10}$ cfu/ml. In addition, the pH values of the synbiotic carrot juices with free cells were lower than pH values of carrot juice with microencapsulated cells during all investigation period (Fig. 2).

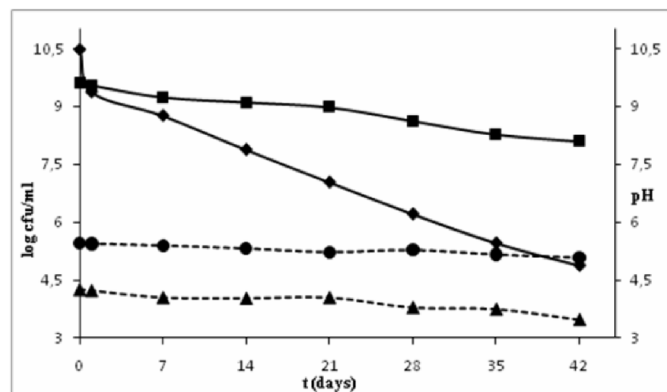


Fig. 2. Changes in viability and pH values during cold storage of fermented carrot juice with free and microencapsulated *L. casei*

The results showed that the survival rate of free probiotic cells in carrot juice was below the therapeutic level at the end of the test due to their sensitivity to the acidic conditions in the medium and need protection to maintain the viability during storage. Results also showed that adding of encapsulated *L. casei* in carrot juice as synbiotic chitosan-Ca-alginate microparticles might solve the problem. Regarding the sensory characteristics of the carrot juice with microparticles non-significant changes of the textural quality due to the low particle size was observed. Therefore, carrot juice containing synbiotic microparticles may be a new functional product and the effect of particles on the consumer acceptance should be further studied.

REFERENCES

1. Sheehan, V.M., Ross, P., & Fitzgerald, G.F. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2007, 8(2):279-284.
2. Ray, R.C., & Sivakumar, P.S. Traditional and novel fermented foods and beverages from tropical root and tuber crops: review. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2009; 44(6):1073-1087.
3. Yoon, K.Y., Woodams, E.E., and Hang, Y.D. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. *J. Microbiol.*, 2004, 42(4):315-318.
4. Vinderola, G.C., & Reinheimer, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, *Bifidobacteria* and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *Int. Dairy J.*, 2000, 14(4):271-275.
5. Mladenovska, K., Raicki, R.S., Janevik, E.I., Ristoski, T., Pavlova, M.J., Kavrovski, Z., Dodov, M.G., Goracinova, K. Colon-specific delivery of 5-aminosalicylic acid from chitosan-Ca-alginate microparticles. *Int. J. Pharm.* 2007; 342(1-2):124-136.

ВИТАЛНОСТ НА *L. CASEI* ВО СИНБИОТСКИ СОК ОД МОРКОВ ВО УСЛОВИ НА ФЕРМЕНТАЦИЈА И ЧУВАЊЕ

Т. Петреска Ивановска¹, Л. Петрушевска Този¹, Ј. Хаџиева¹, К. Смилков², Н. Гешковски¹, К. Младеновска¹

¹Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Фармацевтски факултет, Водњанска 17, 1000 Скопје, Македонија

²Универзитет "Гоце Делчев", Факултет за медицински науки – фармација, Крсте Мисирков бб, 2000 Штип, Македонија

ВОВЕД

Покрај традиционалната примена на млечните производи за испорака на пробиотици во хуманиот ГИТ, пријатниот и освежувачки вкус на овошните сокови го зголемува интересот за апликација на пробиотиците во различни сокови (1). Интересот се должи на отсуството на млечни алергени и холестерол во овошните сокови (2), како и на присутните минерали, витамини и антиоксиданси во овошјето и зеленчукот (3). Киселата средина на сокот може значајно да ја намали виталноста на пробиотиците, а зголемување на виталноста може да се постигне со инкапулирање на клетките. Во овој труд, следена е виталноста на *L. casei* во синбиотски сок од морков со слободни и инкапулирани клетки за време на ферментација и чување во тек на 6 недели.

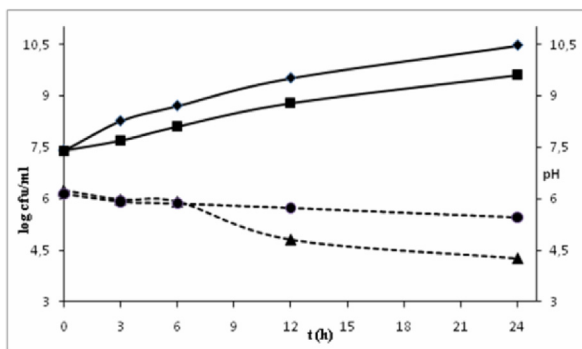
МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Сокот од морков беше подготвен со екстракција на измиени и излупени моркови без додадена вода и нутриенти и со примена на пастеризација (80 °C, 20 min). Клеточната суспензија на *L. casei* (Chr. Hansen, Denmark) беше поделена на два дела. Едниот беше наменет за микроинкапулирање, додека другиот беше аплициран во сокот

заедно со пребиотикот фруктоолигосахарид (ФОС) (Sigma-Aldrich, USA). Почетната концен-трација на *L. casei* ($7.4 \pm 0.1 \log_{10}$ cfu/ml) беше избрана врз основа на препораките за минимален број на витални клетки на g или ml производ за предизвикување на позитивни ефекти врз здравјето (4). Микрочестичките беа подготвени со модифициран метод на спреј сушење (5), така што водна дисперзија на алгинат (LF 10/60, Protanal, FMC Biopolymers, USA), ФОС и *L. casei* беше распрната со сушење (d диза 0.7 mm, проток 6 ml/min, аспирација 90%, влезна и излезна температура, 120 °C and 60 °C, Büchi Mini Spray Dryer B-290, SW) проследено со полиелектролитно комплексирање и вкрстено поврзување во раствор на цитозан (Chitine, France) и CaCl₂ (Merck, Germany) во 1% w/w оцетна киселина. По 3 h мешање, честичките беа одделени со центрифугирање и лиофилизирани (-50 °C, 0.070 mbar, 24 h, Freeze-Dryer, Labconco, USA). Со примена на 4% (w/w) алгинат, 0.5% (w/w) цитозан и 5% (w/w) CaCl₂, беше подготвена оптимална формулација на честички со позитивен површински полнеж (21.5 ± 1.5 mV), големина од $9.1 \pm 0.8 \mu\text{m}$, содржина на Ca од $9.4 \pm 0.1\%$ и виталност на *L. casei* од $11.3 \pm 0.15 \log_{10}$ cfu/g. Микрочестичките беа веднаш аплицирани во сокот. Потоа, примероците беа сместени во стерилни Erlenmeyer садови со памучни затворувачи и ферментирани во тек на 24 h на 37 °C во инкубатор. Виталноста на *L. casei* беше одредувана периодично во тек на 24 h и потоа еднаш неделно во услови на чување на 4 °C. Виталноста на *L. casei* беше определена со додавање на 9 ml пептонска вода на 1 ml примерок, вортексирање на содржината 15 s и сериско разредување со пептонска вода. Броенето на колониите беше вршено со примена на методот на броене на плоча на MRS agar (Merck, Germany) по инкубација на засадените плочи за време од 72 h на 37 °C. Виталноста на инкапсулираните клетки беше одредена со одделување на честичките од сокот со филтрирање. Суспензијата на честички во фосфатен пуфер (pH 6.9) беше вортексирана 30 s и оставена на собна температура. Потоа постапката за одредување на виталноста е идентична како што е претходно опишано. pH вредностите на синбиотските сокови од морков со слободни и инкапсулирани клетки од *L. casei* беа исто така испитувани (pH meter PB 11 Sartorius, Germany).

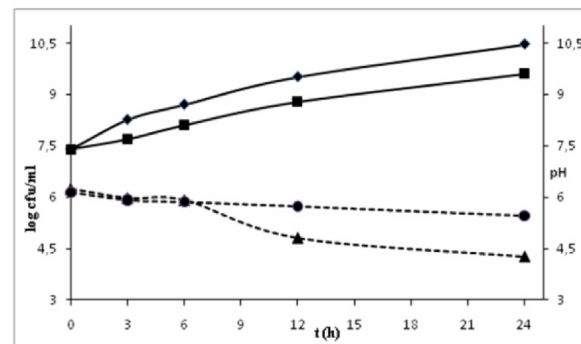
РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

При ферментирање на сокот од морков беше забележан брз раст на *L. casei*, и тоа повисок раст покажаа слободните клетки. На крајот од ферментациониот период, pH вредноста на сокот со слободни пробиотски клетки беше пониска од сокот кој содржи инкапсулирани клетки (Сл. 1).



Сл. 1. Промени на виталноста на *L. casei* и pH вредноста на синбиотскиот сок од морков за време на ферментација

По 6 недели чување на 4 °C, виталноста на микроинкапсулираниот *L. casei* во фермен-тиран сок од морков беше $8.1 \pm 0.13 \log_{10}$ cfu/ml, додека виталноста на слободните клетки беше $4.89 \pm 0.1 \log_{10}$ cfu/ml. pH вредноста на сокот со слободни клетки беше пониска од pH вредноста на сокот со инкапсулирани клетки за целокупниот период на чување на 4 °C (Сл. 2).



Сл. 2. Промени на виталноста на *L. casei* и pH вредноста на ферментираниот сок од морков за време на чување на 4 °C

Резултатите покажаа дека виталноста на слободните пробиотски клетки во сок од морков не го задоволува терапевтското ниво во услови на чување што се должи на нивната осетливост кон киселата pH на сокот. Одржувањето на виталноста на *L. casei* при чување на сокот може да се подобри со инкапсулирање на клетките во облик на цитозан-Са-алгинатни честички. Со аплицирање на синбиотските микро-честички не беа забележани значајни промени на органолептичките својства и текстурата на сокот од морков како резултат на малите честички. Оттука произлегува можната употреба на сокот од морков со синбиотски микрочестички како нов функционален производ, при што следи проценка на ефектот на честичките врз прифатливоста од потрошувачите.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sheehan, V.M., Ross, P., & Fitzgerald, G.F. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2007, 8(2):279-284.
2. Ray, R.C., & Sivakumar, P.S. Traditional and novel fermented foods and beverages from tropical root and tuber crops: review. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2009; 44(6):1073-1087.
3. Yoon, K.Y., Woodams, E.E., and Hang, Y.D. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. *J. Microbiol.*, 2004, 42(4):315-318.
4. Vinderola, G.C., & Reinheimer, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, *Bifidobacteria* and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *Int. Dairy J.*, 2000, 14(4):271-275.
5. Mladenovska, K., Raicki, R.S., Janevik, E.I., Ristoski, T., Pavlova, M.J., Kavrovski, Z., Dodov, M.G., Goracinova, K. Colon-specific delivery of 5-aminosalicylic acid from chitosan-Ca-alginate microparticles. *Int. J. Pharm.* 2007; 342(1-2):124-136.

TARGETED AND NON-TARGETED LCMS METHODS FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF TOXICOLOGICALLY RELEVANT COMPOUNDS

Shaun Bilborough

Agilent Technologies

Screening of complex samples using mass spectrometry may follow two independent workflows applying either targeted or non-targeted methods. With target analysis, triple quadrupole mass spectrometers are used to screen and quantitate a specific predefined list of compounds. Additionally, recent developments in spectral library searching based upon multiple MRM transitions of each compound allows for confirmation of the identity of the target analyte. Although such methods remain the most sensitive with the lowest limit of quantitation, there is a clear disadvantage when applied to toxicology screening as analytes that are not part of the target list are not detected. For complete screening of complex samples, non-target analysis using time of flight mass spectrometry offers the advantage of generating full scan data, allowing the analyst to mine the results and find all compounds present within the sample. Additionally, the accurate mass capability of such instruments allows for elemental composition prediction to facilitate identification of relevant compounds using accurate mass databases. However, in such cases, false positives are routinely encountered and accurate mass alone will not help with the identification of isomeric drugs. This has led to the development of the Broecker, Herre and Pragst accurate mass MSMS spectral library, which allows confirmation of identity through comparison of accurate mass MSMS data with library spectra. In this presentation, we provide an overview of the two techniques applied to toxicology screening together with recent developments allowing confirmation of identity.

MYELOPEROXIDASE - RISK FACTOR FOR CARDIOVASCULAR DISEASE

Milena Spasovska¹, Despina Efremova², Silvija Nesova³, Tatjana Kadifkova Panovska⁴

¹P.H.U. "Prima"- Ohrid,

²Replek AD- Skopje,

³P.H.U. "Naris"-Veles,

⁴Faculty of Pharmacy- Skopje

Myeloperoxidase (MPO) is a leukocyte-derived enzyme that catalyzes the formation of a number of reactive oxidant species. In addition to being an integral component of the innate immune response, evidence has emerged that MPO-derived oxidants contribute to tissue damage during inflammation. MPO-catalyzed reactions have been attributed to potentially proatherogenic biological activities throughout the evolution of cardiovascular disease, including during initiation, propagation, and acute complication phases of the atherosclerotic process. As a result, MPO and its downstream inflammatory pathways represent attractive targets for both prognostication and therapeutic interven-

tion in the prophylaxis of atherosclerotic cardiovascular disease (KVD). The essential role of MPO as a component of the innate immune response to foreign invasion was first recognized nearly 4 decades ago. Spurred initially by the recognition that MPO is enriched within human atheroma, both MPO and its reactive oxidants have been implicated as participants in tissue injury during a large number of inflammatory conditions.

The Human Experience: Multiple lines of evidence suggest that MPO may play a role in atherogenesis in humans. Early studies localized MPO and its products as being enriched within human atherosclerotic plaques. Individuals with total or subtotal MPO deficiency, a defect with a frequency of 1 in every 2000 to 4000 whites, appear less likely to have CVD develop. Increasing systemic levels of MPO have also been demonstrated to predict the presence of angiographic coronary artery disease. Individuals who possess MPO levels in the fourth quartile among sequential subjects undergoing diagnostic cardiac catheterization at a tertiary referral center were 15- to 20-fold more likely to demonstrate abnormal coronary angiograms compared with subjects in the lowest quartile. This relationship remained significant after statistical adjustments for Framingham risk score and C-reactive protein. In addition, plasma and serum levels of MPO have been shown to predict risks of subsequent major adverse cardiac events (nonfatal myocardial infarction, death, and need for revascularization) in patients presenting with either chest pain or acute coronary syndromes.

The Mouse Experience: In contrast, data from animal studies of atherosclerosis have failed to demonstrate such relationships. When low-density lipoprotein (LDL) receptor in experimental mice underwent irradiation and subsequent infusion of bone marrow, the extent of atherosclerotic lesions actually modestly increased. These results suggested that MPO has little role, or may even be atheroprotective, in experimental mice.

These findings highlight a clear species difference between: atherosclerosis in human and experimental mice. This has led to the conclusion that common mouse models of atherosclerosis may not permit investigation of the potential involvement of MPO in human atherogenesis. Although experimental mice with atherosclerosis to date have yet to demonstrate the presence of MPO or its catalytic activity within the target organ/tissue, it is notable that more acute inflammation models in mice demonstrate both the presence of MPO and its oxidation products. Models of mice in which both MPO and its oxidative products are observed have been used to support a key role for the enzyme in promotion of lipid peroxidation, and other oxidative modifications, endothelial dysfunction, and adverse ventricular remodeling in the setting of acute myocardial infarction, as discussed.

A role for MPO throughout the evolution of the atherosclerotic process has been supported by numerous investigations. Mechanistic links exist between MPO and the generation of atherogenic lipoproteins, consumption of nitric oxide (NO), and development of endothelial dysfunction, initiation and propagation of the mature atheroma and its subsequent complications of plaque rupture, thrombosis, and ventricular remodeling.

The many links between MPO and proatherogenic activities that might participate in many stages of cardiovascular disease has stimulated considerable interest in the development of therapeutic strategies to inhibit MPO catalysis. One potential difficulty with development of an MPO inhibitor is the concern that such a drug might have adverse effects related to impairment in the role of enzymes in innate host defenses. It should be noted, however, that only subjects with profound (near total or complete) deficiencies in MPO appear to have a significant increase in risk for infections, and only in the setting of con-

comitant factors that predispose to immunosuppression, such as diabetes. MPO stores within leukocytes may be relatively protected from inhibition because the enzyme is stored in a crystalline form within granules and only released into the phagolysosome compartment and extracellular space upon leukocyte activation. As a result, through use of more polar inhibitors, it may be possible to target extracellular MPO, such as enzyme trapped within the subendothelial space, and not to significantly impede leukocyte killing of phagocytosed pathogens. The development of MPO inhibitors awaits further investigation.

REFERENCES

1. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340: 115–126.
2. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med.* 1980; 93: 480–489.
3. Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda CE, Hazen SL. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem.* 2002; 277: 46116–46122.

МИЕЛОПЕРОКСИДАЗА - РИЗИК ФАКТОР ЗА КАРДИОВАСКУЛАРНИ ЗАБОЛУВАЊА

Милена Спасовска¹, Деспина Ефремова², Силвија Нешова³, Татјана Кадифкова Пановска⁴

¹П.З.У Аптека “Прима”- Охрид

²Групација Реплек АД- Скопје

³П.З.У Аптека “Нарис”- Велес ⁴Фармацевтски факултет-Скопје

Миелопероксидаза (МПО), е ензим кој се наоѓа во леукоцитите и, катализира голем број на оксидативни реакции. Учествува во имуниот одговор и голем број податоци укажуваат дека оксидативните деривати на МПО учествуваат во оштетување на ткивото за време на инфламација. Катализираните реакции од МПО имаат проатерогена активност во развој на кардиоваскуларни заболувања, почнувајќи од иницијација, развој и акутни компликациски фази на атеросклеротични процеси. Како резултат на тоа, МПО и инфламаторните процеси се проучуваат со цел да се предвиди и да се интервенира во профилакса на кардиоваскуларни заболувања (КВЗ).

Улогата на МПО како компонента на вродениот имун одговор била откриена пред 4 децении. Со откривањето дека МПО се наоѓа во атероматозните плаки на човекот, МПО и неговите реактивни оксиди се набљудувани како учесници во ткивно оштетување за време на инфламаторни процеси.

Истражувања кај човек: Голем број на податоци укажуваат дека МПО придонесува за атерогенеза кај човекот. Новите истражувања покажуваат дека атеросклеротичните плаки се богати со МПО и неговите продукти. Индивидуите со тотална или субтотална дефицитарност на МПО, што се јавува кај 1 на секои 2000 до 4000 индивидуи во популацијата кај белата раса, имаат помала веројатност за развој на КВЗ. Зголемените системски вредности на МПО предвидуваат зголемено присуство на коронарна артериска болест. Индивидуите кои имаат повисоки вредности на МПО, имаат абнормален коронарен ангиограм (тоа е потврдено со нивна дијагностичка кардијална катетеризација во здравствени установи). Ова корелација останува сигнификантна после статистичка обработка на Framingham ризик фактор (тест за определување на

можноста за развој на КВЗ во наредните 10 години) и С – реактивниот протеин. Серумските и плазма вредности на МПО укажуваат на ризик за настанување на посериозни кардијални заболувања (нефатален миокардијален инфаркт, смрт и потреба од реваскулизација) кај пациенти кои чувствуваат градна болка или акутен коронарен синдром.

Истражувања кај експериментални глвци: Податоците од истражувањето кај животните за атеросклероза не покажуваат ваква поврзаност. Кога рецепторот за липопротеин со мала густина (ЛДЛ) кај експериментални глвци се изложи на радијација и последователно се додава инфузија од коскена срцевина, степенот на атросклеротични лезии умерено се зголемува. Овие резултати покажуваат дека, кај експериментални модели на глвци кои имаат атеросклероза, МПО има мала улога, па дури покажува и атеропротективен ефект.

Наодите покажуваат јасна разлика помеѓу видовите: атеросклероза кај човек и експериментални глвци. Ова не упатува на заклучок дека моделите на глвци со атросклероза не можат да се користат при истражување за потенцијално учество на МПО во атерогенеза кај човек. Иако моделите на глвци со атеросклероза до сега не покажале присуство на МПО или каталитичка активност во целиот орган или ткиво, значајно е дека кај глвци кои имаат акутна инфламација има присуство на МПО и негови оксидативни продукти. Моделите на глвци каде МПО и неговите оксидативни продукти се набљудувани, се користат за да се докаже главната улога на ензимите во развојот на липидна пероксидација, и други оксидативни модификации, ендотелна дисфункција, и вентрикуларно ремоделирање во утврдување на акутен миокардијален инфаркт.

Улогата на МПО во развој на атеросклеротични процеси е подржана со голем број на истражувања. Постои поврзаност меѓу МПО и создавањето на атерогени липопротеини, искористувањето на азотен оксид (NO) и развојот на ендотелна дисфункција, иницијација и развој на зрела атеросклерозна плака и појава на руптура, тромбоза и вентрикуларно ремоделирање.

Поврзаноста на МПО и проатерогена активност која може да учествува во развој на повеќе фази на кардиоваскуларни заболувања, е искористена за развој на терапевтски стратегии за инхибирање на катализата на МПО. При развој на инхибитор на МПО се појавува проблем дека лекот ќе влијае негативно на учество на ензимите во вродениот имун одговор. Индивидуите со вкупен недостаток на МПО имаат зголемен ризик за развој на инфекција како и тие со дијабет, кои имаат предиспозиција за развој на имуносупресија. МПО кој се наоѓа во леукоцитите може делумно да се заштити од инхибиција бидејќи ензимот е складиран во кристална форма на гранулите и е ослободен само во фаголизозомскиот дел и екстрацелуларниот простор при леукоцитна активација. Со употреба на поларни инхибитори, може да се таргетира екстацелуларна МПО, како ензим кој се наоѓа во субендотелниот простор а не го попречуваат уништувањето на фагоцитирани патогени од страна на леукоцитите. МПО инхибиторите подлежат на понатамошно истражување.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340: 115–126.
2. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med.* 1980; 93: 480–489.
3. Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda CE, Hazen SL. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem.* 2002; 277: 46116–46122.

SCIENCE AS A TOOL FOR PROTECTING THE WORKING ENVIRONMENT: DRUG AND ALCOHOL ABUSE IN THE WORKPLACE

Zoran Kavrakovski, Katerina Jugreva, Biljana Bauer Petrovska

Faculty of Pharmacy, University "Ss. Cyril and Methodius" Skopje

Is the safety of our workplace, of other employees and of the general public jeopardized if employees abuse drugs and consume alcohol before or during working hours? Often enough drugs and alcohol are a real and definite risk for the employees safety in a work environment (1). More than 50% of employees worldwide are connected with misuse of readily available drugs, and 70% of them with alcohol abuse in the workplace (2, 3).

Testing for alcohol and drug abuse in the workplace should be a new legal regulation, mandatory for all employees in the Republic of Macedonia. The introduction of the drug testing program should at the same time be an introduction to the process of solution making that will signify greater safety in the workplace. Therefore we need to devise the work methodology and to review all the necessary tests which need to be conducted among employees in order to determine whether there is an alcohol and drug abuse in the workplace. Trials of drugs will primarily be carried out for easily available drugs and drugs that might be detrimental to the body, such as cocaine, cannabinoids, designer drugs, prescribed medications not used for medical purposes, inhalants, hallucinogens and narcotics (4). The presence of alcohol can be also detected, as well as the presence of other active substances within the drug (having a significant effect on the CNS), which may affect the psycho-somatic ability of the employees (5). Alcohol and drug abuse is closely connected with the reduction of the national production capacity and the reduction of the working-age population due to injuries, illnesses or death.

Poison Control Centre (PCC) can take part in designating specific measures and actions to help all employers and managers who are interested in the development and improvement of the programs for testing alcohol and drug abuse in the workplace by organizing educational courses, workshops and conferences regarding the benefits and the significance of the health and safety effects of these investigations in the working and life environment. For many employers, the drug and alcohol testing program shall certainly impose less absence from work, less changes in shifts within the work team, improved health, safety and morale of the employees, as well as increase of efficiency and productivity at work.

The drug testing program in the workplace can be carried out not only on all new applicants before being employed in the service, but on the already employed ones as well. This is of great significance for employees in workplaces with a high risk of injury or illness, as well as other job positions defined as high-risk and sensitive in terms of health and safety of the employees, their associates and customers. For instance, job positions in organic-chemical and oil industry, construction, aviation, tourism and transportation of passengers, technical and health care, police and military structures, working with dangerous and harmful chemicals, explosives etc. Drug abuse testing shall be carried out before employment, after a certain incident, purposefully and periodically. Currently, studies for drug abuse testing programs among employees in the Republic of Macedonia are only a legal

challenge. There is still no legislation which can provide answers to a number of questions in terms of the implementation of the new safety strategy in the work environment, the means of monitoring danger of hazards, the implementation of several necessary points such as prevention, education, rehabilitation, and providing a clear definition of the rights and accountability of employees and employers.

Testing of alcohol and drug abuse in the workplace should be made in accordance with the principles of ethics, codes of conduct in the workplace, as well as with the privacy protection policy and the guaranteed human rights. Employees must be acquainted with the testing program before signing consent for these trials. Employees shall be informed by safe means of announcements and publications made by PPC in collaboration with regulatory agencies and interested companies. An employer must not force the employees to take these trials by means of threat or physical abuse. Liability for refusal to participate in the drug testing program and disciplinary measures should be determined by legislation, as well as by their individual or collective employment agreements.

Alcohol and drug abuse in the workplace is not an issue only for an isolated group of employees or addicts who can be easily identified. The issue requires a complete and comprehensive approach of all stakeholders at different levels in order to raise awareness of the risk and the potential danger of drug abuse in the workplace, and to determine future actions for implementation of the new strategic solutions. In this way we shall provide our fullest contribution to the Declaration and the efforts of the UN General Assembly from 1998 by promoting and implementing a drug-free workplace program.

REFERENCES

- Ghodse H. Addiction at work: tackling drug use and misuse in the workplace. Gower Publishing Ltd, UK, 2005.
- Bennett J., Lehman W. Preventing workplace substance abuse. Beyond drug testing to wellness. American Psychological Association Washington, DC, 2000
- National Drug Strategy Household Survey: Detailed findings, Australian Institute of Health and Welfare, Canberra, 2002
- Breugem L. et al. The Impact of Alcohol and Other Drugs in the Workplace. SafeWork SA, 2006
- WorkCover Corporation of South Australia. Alcohol and other drugs in the workplace. Guide to developing a workplace alcohol and other drugs policy.
- WorkCover Authority of NSW, Sydney, 2006

НАУКАТА ВО ЗАШТИТА НА РАБОТНАТА СРЕДИНА: ЗЛОУПОТРЕБА НА ДРОГИ И АЛКОХОЛ НА РАБОТНОТО МЕСТО

Зоран Кавраковски, Катерина Југрева, Билјана Бауер Петровска

Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј" Скопје

Дали е загрошена нашата безбедност на работното место, на останатите вработени, како и на пошироката јавност ако вработените ги злоупотребуваат дрогите и алкохолот пред или во тек на работното време? Дрогите и алкохолот се многу често, реален и потврден ризик за безбедноста на вработените во работната средина (1). Повеќе од 50% од вработените во светски рамки се поврзуваат со злоупотреба на лесно достапни дроги, а 70% од нив со злоупотреба на алкохол на работното место (2,3). Испитувањата за злоупотреба на дрогите и алкохолот во работната средина, треба да биде нова законска обврска, задолжителна за сите вработени во Република Македонија. Воведувањето на програмата за испитување на оваа проблематика треба истовремено да биде и вовед во креирањето на одредени решенија кои ќе значат поголема безбедност во работната средина. Поради тоа ќе треба да се утврди методологијата за работа и да се направи преглед на потребните испитувања кои треба да се спроведат кај вработените со цел да се утврди злоупотребата на дрогите и алкохолот во работната средина. Испитувањата на дрогите во работната средина, првенствено ќе се спроведуваат за лесно достапните и други дроги кои можат да предизвикаат оштетување во организмот, како што се кокаин, канабиноиди, дизајнерски дроги, пропишани лекови кои не се употребуваат во медицински цели, инхаланти, халуциногени дроги и наркотици (4). Исто така, може да се испитува и присуството на алкохолот, како и на другите активни супстанции во состав на лековите (со изразено дејство врз ЦНС), кои може да влијаат врз психо-физичката способност на вработените (5). Злоупотребата на дрогите и алкохолот е тесно поврзана со намалување на националните производни капацитети и со намалување на работоспособното население поради повреди, болести или смрт.

Центарот за контрола на труење може да учествува во изготвување на одредени мерки и активности за да им помогне на сите работодавачи и менаџери кои се заинтересирани за развојот и усовршување на програмите за испитување на злоупотребата на дрогите и алкохолот во работната средина преку организирање на едукативни курсеви, работилници и советувања во врска со придобивките и значењето на здравствените и безбедносните ефекти од овие испитувања во работната и животната средина. За многу работодавачи програмата за испитување на дрогите и секако алкохолот ќе значи намалување на отсуството од работа, намалување на промените во тимот (при работа во смени), подобрување на здравјето, безбедноста и моралот на вработените, како и зголемување на ефикасноста и продуктивноста во работата. Испитувањата на злоупотребата на дрогите во работната средина може да се врши на сите нови кандидати, пред вработување во службата, но и на веќе вработените. Ова особено е значајно за вработените на сите работни места на кои постои висок ризик од повреда или болести, како и за другите работни места кои се дефинирани како високоризични и чувствителни од аспект на заштита на здравјето, безбедноста и животот на вработените, на

нивните соработници и на клиентите. На пример: работните места во органско-хемијската и нафтената индустрија, во градежништвото, во воздухопловството, во туризмот и транспортот на патниците, во техничката и здравствената заштита, во полициско-воените структури, работа со опасни и штетни хемикалии, експлозивни и др. Испитувањата на злоупотреба на дрогите и алкохолот ќе се вршат пред вработување, по инцидент, наменски и периодично.

Програмите за испитување на злоупотребата на дрогите и алкохолот кај вработените во Република Македонија во моментов се законски предизвик. Се уште не постои правна регулатива која ќе треба да одговори на многу прашања, од аспект на имплементација на новата стратегија за безбедност во работната средина, начините на мониторирање на опасноста, спроведување на превенција, на едукацијата, на рехабилитацијата, како и јасно дефинирање на правата и одговорноста на вработените и работодавачите.

Испитувањата на злоупотребата на дрогите и алкохолот на работното место треба да се направат во согласност со начелата на етичките принципи и кодексите за однесување во работната и животната средина, како и во склад со правата за заштита на приватноста и загарантираните човекови права. Вработените мора да се запознаат со програмата за испитување пред да ја потпишат согласноста за овие испитувања. Информирањето на вработените ќе се врши преку безбедносни соопштенија и публикации кои ги подготвува Центарот во соработка со регулаторните агенции и заинтересирани фирми. Работодавачот не смее да ги принудува вработените на овие испитувања со закани или со употреба на физичка сила. Одговорноста за одбивањето и дисциплинските мерки за неучеството на вработените во програмата за испитување треба да се утврдат со законските акти, како и со нивните индивидуални или колективни договори за вработување.

Злоупотребата на дрогите и алкохолот во работната средина не е проблем само на изолирана група вработени или на зависници кои лесно можат да се идентификуваат. Потребен е целосен и сеопфатен пристап на сите засегнати страни на различни нивоа во насока кон подигање на свеста за ризикот и потенцијалната опасност од нивната злоупотреба на работното место, како и утврдување на идни акции за имплементација на нови стратешки решенија. На ваков начин ќе дадеме целосен придонес кон Декларацијата и заложбите на Генералното собрание на ООН од 1998 година за промоција и имплементација на програмата за работна средина без дроги.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ghodse H. Addiction at work: tackling drug use and misuse in the workplace. Gower Publishing Ltd, UK, 2005.
2. Bennett J., Lehman W. Preventing workplace substance abuse. Beyond drug testing to wellness. American Psychological Association Washington, DC, 2000 2001
3. National Drug Strategy Household Survey: Detailed findings, Australian Institute of Health and Welfare, Canberra, 2002
4. Breugem L. et al. The Impact of Alcohol and Other Drugs in the Workplace. SafeWork SA, 2006
5. WorkCover Corporation of South Australia. Alcohol and other drugs in the workplace. Guide to developing a workplace alcohol and other drugs policy. WorkCover Authority of NSW, Sydney, 2006

NEW TRENDS IN BIOMONITORING: APPLICATION OF RAPD-PCR AND PLANT MODEL SYSTEMS TO GENETIC ECOTOXICOLOGY

Darinka Gjorgieva¹, Tatjana Kadifkova-Panovska², Saša Mitrev³, Biljana Kovacevik³, Emilija Kostadinovska³

¹Faculty of Medical Sciences, Goce Delčev University, Štip, R. Macedonia,

²Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril and Methodius University, Skopje, R. Macedonia,

³Faculty of Agriculture, Goce Delčev University, Štip, R. Macedonia

Pollution of the environment has become a major concern of society. Perhaps one of the more serious concerns is the potential for exposure to substances that are genotoxic, potentially carcinogens and mutagens with the capacity to affect both the structural integrity of DNA and the fidelity of its biological expression [Wogan and Gorelick, 1985]. Genetic toxicology is an area of science in which the interaction of DNA-damaging agents with the cell's genetic material is studied in relation to subsequent effect(s) on the health of the organism. Structural changes to the integrity of DNA caused by DNA-damaging agents are useful endpoints for assessing exposure to hazardous environmental pollutants on human health [CBMNRC, 1987; Atienzar and Jha, 2006] and biota [Enan MR, 2006]. Genetic ecotoxicology is an approach that applies the principles and techniques of genetic toxicology to assess the potential effects of environmental pollution, in the form of genotoxic agents, on the health of the ecosystem. Because the techniques and methods unique to these disciplines are extremely sensitive and specific it is anticipated that their implementation into studies concerned with the mechanism of action of genotoxicants will provide a stronger scientific basis for the assessment of risk of exposure. Bioindicators of contamination make it possible to detect subtle forms of pollution that are hard to measure in the field.

In this paper we evaluated the application of RAPDs as molecular marker to detect DNA damage in plant model systems caused by environmental pollutants. Results showed that RAPD-PCR technique is a powerful tool for screening DNA damage induced by non-lethal levels of organic and inorganic contaminants.

Plants are good bioindicators because (i) they play a significant role in food chain transfer and in defining habitat, (ii) they are easy to grow and adaptable to environmental stress, (iii) they can be used for assaying a range of environmental conditions in different habitats. Furthermore, plant-based assays applied to toxicity screening in the environmental field would reduce animal sacrifice and testing costs. The use of plants as bioindicators of genetic toxicity of environmental pollutants has been reported in several studies [Grant WF, 1994; Knasmüller et al., 1998]. Mutagenic activity of chemicals has been analysed with different plant systems such as *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Trifolium repens*, *Phaseolus vulgaris* and many others [Fiskesjo G, 1997; Enan MR, 2006; Cenkci et al., 2009] and chromosome aberration assays, mutation assays and cytogenetic tests were performed with these systems. The advantage of measuring the effect of genotoxic chemical directly on DNA is mainly related to the sensitivity and the short response time. Recently, enormous advances and developments in molecular biology have provided new ways of detecting DNA damage [Conte et al., 1998; Savva D, 2000]. Following the original description of the PCR [Mullis and Faloona, 1987], modifications were

described enabling the generation of DNA fingerprints and their use in detecting genotoxicity. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) of these techniques can be used to detect genotoxicity and differences in RAPD profiles and can clearly be shown when comparing DNA fingerprints from untreated and treated individuals to genotoxic agents [Atienzar and Jha, 2006; Enan 2006; Cenkci et al. 2009].

In the field of ecotoxicology, most RAPD studies describe the RAPD changes such as differences in band intensity as well as gain/loss of RAPD bands. RAPD profiles generated by samples exposed to genotoxic agents in all cases were different from those obtained using control DNA. One class of genetic effects includes alterations to the structure and function of DNA including DNA adducts, DNA breakage, and mutations as a result of chemical exposure (genotoxic effects). Biomonitoring should act as an early warning system providing information about the seriousness of the pollution by sensitive assays, especially for existing potential genotoxic problem assessment, since most polluting substances have shown genotoxic effect. A further consideration is that changes in the DNA fingerprints obtained may be used to identify target genes for particular genotoxic agents. Characterisation of these DNA molecules using DNA sequencing techniques may enable the identification of specific sequences that are hotspots for mutation by particular agents; this will open up possibilities of designing specific assays for detection of specific agents and may help explain the presence in the genome of preferential mutation points.

REFERENCES

- Atienzar FA, Jha AN (2006) The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutat Res* 613: 76-102
- Cenkci S, Yildiz M, Ciğerci IH, Konuk M, Bozdağ A (2009) Toxic chemicals-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Chemosphere* 76: 900-906
- Committee on Biological Markers of the National Research Council (1987) Biological markers in environmental health research. *Environ Health Perspec*. 74:3-9.
- Conte C, Mutti I, Puglisi P, Ferrarini A, Regina GRG, Maestri E, Marmiroli N (1998) DNA fingerprint analysis by PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. *Chemosphere* 37:2739- 2749.
- Enan MR (2006) Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. *Biotechnol Appl Biochem* 43: 147-154
- Fiskesjo G (1997) *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. In: Wang W, Gorsuch JW, Hughes JS. (Eds.), *Plants for Environmental Studies*. Lewis Publishers, New York, pp. 307-333.
- Grant WF (1994) The present status of higher plant bioassay for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.* 310:175-185.
- Knasmüller S, Gottmann E, Steinkellner H, Fomin A, Pickl C, Paschke A, God R, Kundi M (1998) Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutat. Res.* 420:37-48.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Method. Enzymol.* 155:335-350.
- Savva D (2000) The use of Arbitrarily primed PCR (AP-PCR) fingerprinting detects exposure to genotoxic chemicals. *Ecotoxicology* 9: 341-353.
- Wogan GN, Gorelick NJ (1985) Chemical and biochemical dosimetry to exposure to genotoxic chemicals. *Environ Health Perspec.* 62:5-18.

НОВ ТРЕНД ВО БИОМОНИТОРИНГОТ: АПЛИКАЦИЈА НА RAPD-PCR И РАСТИТЕЛНИ МОДЕЛ СИСТЕМИ ВО ГЕНЕТСКАТА ЕКОТОКСИКОЛОГИЈА

Даринка Ѓоргиева¹, Татјана Кадићкова-
Пановска², Саша Митрев³, Билјана Ковачевиќ³,
Емилија Костадиновска³

¹Факултет за медицински науки, Универзитет "Гоце Делчев", Штип, Р. Македонија,

²Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје, Р. Македонија,

³Земјоделски факултет, Универзитет "Гоце Делчев", Штип, Р. Македонија

Загадувањето на животната средина е еден од најголемите проблеми на денешницата. Големо внимание привлекува потенцијалната експозиција на супстанции кои се генотоксични, потенцијално карциногени и мутагени, со капацитет да влијаат и врз структурниот интегритет на DNA и врз биолошката експресија [Wogan and Gorelick, 1985]. Генотоксикологијата е научна област во која истражувањата се насочени кон проучување на интеракциите меѓу агенсите кои индуцираат DNA-оштетувања и клеточниот генетски материјал во корелација со последователните ефекти врз здравјето на организмот. Структурните промени во интегритетот на DNA предизвикани од генотоксични агенси се корисни индикатори за ризик по човековото здравје и останатиот жив свет од експозиција на токсични загадувачи од околната средина [CBMNR, 1987; Atienzar and Jha, 2006; Enan MR, 2006]. Генетската екоксикологија ги користи принципите и техниките од генотоксикологијата за евалуација на потенцијалните ефекти на ксенобиотици од животната средина, во форма на генотоксични агенси, врз целокупната состојба на екосистемот. Бидејќи методите и техниките уникатни за овие дисциплини се екстремно сензитивни и специфични, нивната имплементација во студии кои се однесуваат на проучување на механизмот и дејството на генотоксикантите, може да овозможи обезбедување на научна база за предвидување на ризикот од експозиција. Биоиндикаторите овозможуваат детекција на минимално присутни загадувачи, чие присуство е тешко да се определи во примероци од животната средина.

Во оваа студија ја евалуираме апликацијата на RAPD-фрагментите како молекуларни маркери за детекција на DNA- оштетувања предизвикани од загадувачи на животната средина во растителни модел системи. Резултатите покажуваат дека RAPD-PCR техниката е моќна алатка за скрининг на DNA-оштетувања индуцирани од нелетални дози на органски и неоргански контаминирачки супстанции. Растенијата се корисни биоиндикатори бидејќи (i) играат важна улога во ланецот на исхрана и имаат дефинирана животна средина, (ii) широко се распространети и прилагодливи кон стресот предизвикан од егзогени фактори, (iii) можат да се користат во проучувањето на ефектите на околната средина при најразлични услови. Уште повеќе, примената на растителните модели за евалуација на генотоксичност, го надминува етичкиот момент на користење и жртвување на експериментални животни, што влијае и врз економскиот аспект на испитувањето. Искористувањето на растенијата како биоиндикатори за евалуација на генотоксичност, во последниве неколку години е предмет на испитување од страна на повеќе независни истражувачки тимови [Grant WF, 1994; Knasmuller et al., 1998]. Мутагената активност на хемикалиите е

анализирана со употреба на најразлични растителни модел системи, како *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Trifolium repens*, *Phaseolus vulgaris* и многу други [Fiskesjo G, 1997; Enan MR, 2006; Cenkci et al., 2009] при што користени се различни тестови за откривање на хромозомски аберации, цитогенетски тестови, микронуклеус тест и др. Во последно време, напредокот во молекуларната биологија, придонесува за развој на бројни нови селективни и сензитивни тестови за DNA-анализи кои се карактеризираат со висока чувствителност и кратко време на одговор [Conte et al., 1998; Savva D, 2000]. Следејќи го основниот концепт на класичната полимеразна верижна реакција (PCR) [Mullis and Faloona, 1987], направени се модификации на техниките кои овозможуваат генерирање на DNA "отпечатоци" и нивна употреба во детекцијата на генотоксичноста. Случајно амплифицирана полиморфна ДНК (Random amplified polymorphic DNA - RAPD) техниката може да се користи за детектирање генотоксичност бидејќи разликите во RAPD профилот може јасно да бидат идентификувани со компарирање на DNA-отпечатокот (DNA fingerprints) од третирани и нетретирани примероци со генотоксични агенси [Atienzar and Jha, 2006; Enan 2006; Cenkci et al. 2009]. Настанатите промени во RAPD профилот се разлики во интензитетот на добиените фрагменти и исчезнување и/или појава на нови RAPD- фрагменти. Дел од генотоксичните ефекти кои може да се регистрираат се резултат на промени во структурата и функцијата на DNA како присутни DNA-адукти, DNA-прекини, и/или мутации како резултат на хемиска експозиција. Биомониторингот е всушност ран систем на предупредување кој обезбедува информација за сериозноста на контаминацијата со примена на сензитивни методи, посебно за постоечки потенцијално генотоксични ризици, бидејќи најголемиот дел од загадувачите на животната средина имаат генотоксичен ефект. Следна примена на добиените податоци од овие студии е можноста да промените во DNA "отпечатоците" бидат искористени за идентификација на таргет-гените на специфични генотоксични агенси. Карактеризацијата на овие DNA оштетувања со користење на DNA-секвенцирачки техники може да доведе до идентификација на специфични секвенци кои се мутациони жаришта "hotspots" на специфични генотоксиканти. Оваа можност од своја страна дава правец на дизајнирање специфични методи за детекција на специфични генотоксични агенси и може да го објасни присуството на определени мутациони точки во геномот.

ЛИТЕРАТУРА

- Atienzar FA, Jha AN (2006) The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutat Res* 613: 76-102
- Cenkci S, Yildiz M, Cı̇erci IH, Konuk M, Bozdağ A (2009) Toxic chemicals-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Chemosphere* 76: 900-906
- Committee on Biological Markers of the National Research Council (1987) Biological markers in environmental health research. *Environ Health Perspec*. 74:3-9.
- Conte C, Mutti I, Puglisi P, Ferrarini A, Regina GRG, Maestri E, Marmiroli N (1998) DNA fingerprint analysis by PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. *Chemosphere* 37:2739- 2749.
- Enan MR (2006) Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. *Biotechnol Appl Biochem* 43: 147-154
- Fiskesjo G (1997) Allium test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. In: Wang W, Gorsuch JW, Hughes JS. (Eds.), *Plants for Environmental Studies*. Lewis Publishers, New York, pp. 307-333.
- Grant WF (1994) The present status of higher plant bioassay for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.* 310:175-185.
- Knasmuller S, Gottmann E, Steinkellner H, Fomin A, Pickl C, Paschke A, God R, Kundi M (1998) Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutat. Res.* 420:37-48.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Method. Enzymol.* 155:335-350.
- Savva D (2000) The use of Arbitrarily primed PCR (AP-PCR) fingerprinting detects exposure to genotoxic chemicals. *Ecotoxicology* 9: 341-353.
- Wogan GN, Gorelick NJ (1985) Chemical and biochemical dosimetry to exposure to genotoxic chemicals. *Environ Health Perspec.* 62:5-18.

FINGERPRINT BASED PREDICTION OF GENOTOXICITY OF THIOPHENES

Ksenija Mickova Dimitrova^{1,2}, Igor Kuzmanovski²

¹Промедика, Мито Хадживасилев Јасмин 50/5, 1000 Скопје, Македонија,

²Институт за хемија, ПМФ, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", П.О. Box 162, 1001 Скопје

Genotoxicity testing is performed to assess the potential of compounds to induce genotoxic effects which may cause heritable damage or lead to cancer in humans. *In silico* modeling of genotoxicity is widely used because the developed models are less expensive and time-consuming than *in vivo* and *in vitro* models [1].

As a part of the ongoing research in our laboratory new methodology for classification of compounds according to genotoxicity is proposed for series of thiophene derivatives. These compounds are selected due to their presence in pharmaceuticals and their potential for metabolic activation via CYP450. The modeling of the genotoxicity was performed on experimentally obtained values for genotoxicity using SOS Chromotest for 150 thiophenes [2,3]. For the modeling purposes of the compounds in the data set we calculated a set of PubChem binary fingerprints [4]. The data set consisting of 880 binary fingerprints was reduced down to 108 fingerprints according to their performances in classification of the dataset of analyzed compounds.

Classification models were developed using nonlinear projection algorithm supervised self-organizing maps [5,6]. The selection of the optimal parameters and most suitable fingerprints was performed on automated manner using genetic algorithms [7]. Additionally, using genetic algorithms newly developed approach for adjustment of the relative importance of input variables was applied [8]. The quality of the models was determined by the accuracy, specificity and sensitivity, with preference given to models that have greater sensitivity.

Using the proposed approach we were able to develop suitable models, with excellent generalization performances which were able to successfully classify most of the samples in the independent test set. The model that accurately classify 78% of tested thiophenes have sensitivity of 60% and specificity of 86%. In addition to this, using the variable selection procedure in combination with SSOM algorithm we were able to identify important structural features responsible for the genotoxic activity of this type of compounds.

The results presented in this work represent a novel approach in the field of computational toxicology with potential use for screening and *in vitro* priority testing of the genotoxicity of new compounds with similar structures.

REFERENCES

- Benigni R., Netzeva T, Benfenati E, Bossa C, Franke R, Helma C, Hulzebos E, Marchant C, Richard A, Woo Y T, Yang C. The expanding role of predictive toxicology: An update on the (Q)SAR models for mutagens and carcinogens. *J. Environ. Sci. Health* 2007; 25: 53-97.
- Mosier P D, Jurs P C, Custer L L, Durham S K, Pearl G M. Predicting the genotoxicity of thiophene derivatives from molecular structure. *Chem. Res. Toxicol.* 2003; 16: 721-732.
- Du H, Wang J, Watzl J, Zhang X, Hu Z. Classification structure-activity relationship (CSAR) studies for prediction of genotoxicity of thiophene derivatives. *Toxicol. Lett.* 2007; 177: 10-19.
- <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- Kohonen T. Self-organizing formation of topologically correct feature maps. *Biol. Cybern* 1982; 43:59-69.
- Kohonen T. *Self-Organizing Maps*, 3rd ed. Berlin: Springer, 2001.
- Davis L. *The handbook of genetic algorithms*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.
- Kuzmanovski I, NoviĀ M, Trpkovska M. Automatic adjustment of the relative importance of different input variables for optimization of counter-propagation artificial neural networks. *Anal. Chim. Acta*, 2009; 642: 142-147.

ПРЕДВИДУВАЊЕ НА ГЕНЕТСКА ТОКСИЧНОСТ НА ТИОФЕНИ СО УПОТРЕБА НА МОЛЕКУЛСКИ ОТПЕЧАТОЦИ

Ксенија Мицкова Димитрова^{1,2},
 Игор Кузмановски²

¹Промедика, Мито Хаџивасилев Јасмин 50/5, 1000 Скопје, Македонија,

²Институт за хемија, ПМФ, Универзитет Св. Кирил и Методиј, П. фах 162, 1001 Скопје

Тестирањето на генетската токсичност е неопходно за утврдување на потенцијалот на хемикалиите да предизвикаат ефекти на генетска токсичност која може да доведе до наследни болести или појава на карцином кај луѓето. *In silico* моделирањето на генетската токсичност се користи на широко бидејќи развиените модели се многу поефтини и пократкотрајни од *in vivo* и *in vitro* моделите [1]. Како дел од истражувањето во нашата лабораторија развиена е нова методологија за класификација според генетската токсичност на серија од деривати на тиофен. Тиофените се одбрани за анализа бидејќи истите се присутни во лековите, а освен тоа истите подлежат на метаболичка активација преку CYP450.

Моделирањето на генетската токсичност е направено врз основа на експериментално добиени вредности на генотоксичната активност на 150 тиофени со употреба на SOS Chromotest [2,3]. Структурата на тиофените од множеството за анализа беше претставена преку PubChem молекулски отпечатоци [4]. Од пресметаните 880 бинарни молекулски отпечатоци одбрани се 108 за понатамошна обработка врз основа на нивните перформанси во класификацијата на испитуваните хемикалии.

Моделите за класификација се развиени со употреба на алгоритмот за наelineарно учење само-организирани мапи [5,6]. Одбирањето на оптималните параметри за моделирање и најпогодните молекулски отпечатоци е направено со користење на генетски алгоритми [7]. Дополнително генетските алгоритми се користени за определување на релативната важност на дескрипторите со употреба на ново развиен приод [8]. Квалитетот на добиените модели беше одредуван според нивната точност, специфичност и осетливост, со предност спрема моделите со поголема осетливост.

Со користење на овој приод развиени се погодни модели со одлични способности за генерализација и способност точно да класифицираат најголем број од примероците од независното множество за тестирање. Моделот кој точно ги класифицира 78% од тестираните тиофени покажува осетливост од 60% и специфичност од 86%. Покрај ова процедурата за селекција на променливите во комбинација со само-организираните мапи овозможува да се идентификуваат структурните карактеристики одговорни за генетската токсичност на овој тип на хемикалии.

Резултатите од оваа работа претставуваат нов приод во полето на компјутерската токсикологија со потенцијална употреба за скрининг и приоритетно *in vitro* тестирање на генетската токсичност на нови хемикалии со слична структура.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Benigni R., Netzeva T, Benfenati E, Bossa C, Franke R, Helma C, Hulzebos E, Marchant C, Richard A, Woo Y T, Yang C. The expanding role of predictive toxicology: An update on the (Q)SAR models for mutagens and carcinogens. *J. Environ. Sci. Health* 2007; 25: 53-97.
- Mosier P D, Jurs P C, Custer L L, Durham S K, Pearl G M. Predicting the genotoxicity of

thiophene derivatives from molecular structure. Chem. Res. Toxicol. 2003; 16: 721-732.
Du H, Wang J, Watzl J, Zhang X, Hu Z. Classification structure-activity relationship (CSAR) studies for prediction of genotoxicity of thiophene derivatives. Toxicol. Lett. 2007; 177: 10-19.
http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
Kohonen T. Self-organizing formation of topologically correct feature maps. Biol Cybern 1982; 43:59-69.
Kohonen T. Self-Organizing Maps, 3rd ed. Berlin: Springer, 2001.
Davis L. The handbook of genetic algorithms. New York: Van Nostrand Reingold, 1991.
Kuzmanovski I, Novič M, Trpkovska M. Automatic adjustment of the relative importance of different input variables for optimization of counter-propagation artificial neural networks. Anal. Chim. Acta, 2009; 642: 142-147.

MONITORING OF PERSISTENT ORGANOCHLORINE PESTICIDES IN SUR- FACE WATER OF THE PRESPA REGION

Tatjana Kadifkova Panovska¹, Katerina Sto-
jkovska², Renata Slaveska Raicki¹

¹Faculty of Pharmacy, UKIM, Skopje

²Public Health Institute- Bitola,

Food, drinking water, surface water and the world that surrounds us contain residues of various pesticides [Residues in food, 1988; Vitorovic, 1987; Sofyina, 1991].

Pesticides also tend to concentrate in the food processing [Kuet A., Seng L., 2004], and some of them are potentially carcinogenic substances [Federal Register, 1993].

Acute pesticides poisoning and possibility of chronic poisoning with their residues through food and water is a serious health problem. In this sense toxicological tests are aimed to determine quantity and nature of chemical substances whose input during the entire life have harmful consequences for human health [Jokanovic M., 1999].

National and international scientific and professional activity is aimed at reducing the risk of possible harmful action of pesticides and other chemicals.

FAO [1985], OEDC [1986], made the guidelines that create a basis for safe use of pesticides and other chemicals.

In this way in all civilized countries in the world are trying to control production, trade and use of pesticides and to overcome or minimize the possible consequences of applying these chemicals.

The aim of this paper is the determination of the concentration of the persistent organochlorine pesticides in rivers and surface water in Prespa Region through elaboration of methods for the determination of organochlorine pesticides, which can be used for routine analysis in the routine laboratory practice.

Determination of the content of organochlorine pesticides was done on 80 different samples of surface water for nine sites in the Prespa Region: (1) Village Stenje, (2) Tourist resort Pretor, (3) Tourist resort Otesevo, (4) Beach Slivnica, (5) Tourist resort Krani, (6) Village D. Dupeni, (7) Golema Reka, (8) Brajcinska Reka, (9) Kranska Reka.

Determination of organochlorine pesticides in surface water is done according to EPA 508- Method for simultaneous determination of several organochlorine pesticides in water by gas chromatography and ECD detector.

Multiresidual methods as well as single residual methods cover a few basic stages: extraction of pesticides from the matrix; treatment if necessary, to remove interacting coextractants; separation of analytes from other components typically by GC or HPLC; quantification by comparing the response of the samples with the standard response,

confirmation of the results using an auxiliary method.

The obtained value for concentrations of the tested pesticides showed different representation in the samples. Pesticides Lindan, p,p'DDT, p,p'DDD, p,p'DDE, Aldrin are present in almost all samples. Endosulfan I and II, Dieldrin, Dieldrin are present in about half of the tested samples, while Heptachlor, Heptachlor epoxide, Methochlor, are represented by a significantly smaller number of samples.

In terms of concentration of individual species of organochlorine pesticides, according to the Regulation on water classification is not determined above MDL in any samples. However, according to the determined concentration, a gradation of surface waters from II to IV.

Based on the concentration of pesticides in the tested months, it can be concluded that the most polluted site is (7) Golema Reka and the most clean are: (1) Village Stenje and (6) Village D. Dupeni.

In 53% of the analyzed samples pesticide p,p'DDT is present. The relationship between p,p'DDE and p,p'DDD suggests the persistence of p,p'DDT.

Based on the results it is necessary to take appropriate measures and restricted use of pesticides during the period when we expected their highest concentration.

REFERENCES

1. Ahad K., Ahmed I., Muhhemmed, Aziz S., U.K. Baloach, Determination of pesticide residues in ground water of Mardan division, Pakistan. J. water (South Africa); 26(3):409-412, 2000
2. Darko G., Akato O., Oppong C., Persistent organochlorine pesticide residues in fish, sediment and water from Lake Bosomtwi, Ghana, Chemosphere. 2008 May; 72(1):21-4 Epub 2008 Apr 7
3. Kasozi G.N., Kiremire B.T., Budenyi F.W.B., Kirsch N.H., Organochlorine Residues in water and fish samples from Lake Viktoria, Journal of Chromatography Uganda, 2006
4. Nardeli V., Palmero C., Centoze C., Journal of Chromatography A 1034-33, 2004
5. Sorensen, R.B., Bruggemann L., Carlsen L., Mogensen B.B., Kreuger J., Pundez S., Analysis of monitoring data of pesticide residues in surface water. Environmental Toxicol. Chem.; 22(3); 661-670, 2003

МОНИТОРИНГ НА ПЕРЗИСТЕНТНИ ОРГАНОХЛОРИНИ ПЕСТИЦИДИ ВО ПОВРШИНСКИТЕ ВОДИ ОД ПРЕСПАНСКИОТ РЕГИОН

Tatjana Kadifkova Panovska¹,
Katerina Stojkovic², Renata Slaveska Raicki¹

¹Фармацевтски факултет, УКИМ, Скопје, Македонија,

²ЈЗУ Центар за јавно здравје- Битола, Македонија

Храната, водата за пиење, површинските води и светот кој не опкружува содржат остатоци на различни пестициди [Residues in food, 1988; Vitorovic, 1987; Sofyina, 1991]. Пестицидите исто така покажуваат тенденција на концентрирање во процесот на преработка на храната [Kuet A., Seng L., 2004], а некои од нив се и потенцијално канцерогени материји [Federal Register, 1993].

Акутните труења со пестициди и можноста за хронично труење со нивните остатоци (резидуи) преку храна и вода претставува сериозен здравствен проблем. Во оваа смисла токсиколошките испитувања се насочени во утврдување на количината и природата на хемиската супстанција чие внесување во текот на целиот живот има штетни последици за здравјето на човекот [Jokanovic M., 1999].

Националната и меѓународната научна и стручна активност е насочена кон намалување на ризикот од можното штетно делување на пестицидите и другите хемикалии. FAO [1985], OEDC [1986], изготвиле насоки кои создаваат основа за сигурна употреба на пестицидите и другите хемикалии.

На овој начин во сите цивилизирани земји во светот се настојува да се контролира производството, прометот и користењето на пестицидите и да се надминат или сведат на минимум евентуалните последици од примена на овие хемикалии.

Целта на овој труд е определување на концентрацијата на перзистентни органохлорни пестициди во реки и површински води во Преспанскиот Регион, преку разработка на метода за определување на органохлорни пестициди која може да се користи за рутинска анализа во секојдневната лабораториска практика.

Определувањето на содржината на органохлорни пестициди е извршено во над 80 различни примероци на површински води од девет локалитети во Преспанскиот Регион: (1) Село Стење; (2) Туристичка населба Претор; (3) Туристичка населба Отешево; (4) Плажа Сливница; (5) Туристичка населба Крани; (6) Село Д. Дупени; (7) Голема Река; (8) Брајчинска Река; (9) Кранска Река.

Определувањето на органохлорните пестициди во површинските води е направено според метода EPA 508 - Метода за симултано определување на повеќе органохлорни пестициди во вода со гасен хроматограф и ECD детектор.

Мултирезидуалните методи како и методите за определување на резидуи на само еден пестицид опфаќаат неколку основни фази: екстракција на пестицидот од матриксот на примерокот; пречистување доколку е потребно, за да се отстранат интерферентите; коекстраканти; раздвојување на анализот од останатите компоненти, вообичаено со GC или HPLC; квантификација преку споредување на одговорот на примерокот со одговорот на стандардите; потврда на резултатите со примена на некоја помошна метода.

Добиените вредности за концентрациите на испитуваните пестициди покажаа различна застапеност во примероците. Пестицидите Lindan, p,p'DDT, p,p'DDD, p,p'DDE, Aldrin се присутни во скоро сите примероци.

Endosulfan I и II, Endrin, Dieldrin, се застапени во околу половина од испитуваните примероци, додека Heptachlor, Heptachlor epoksid и Metoksichlor се застапени во значително помал број на примероци. Во однос на концентрацијата на поедините видови на органохлорни пестициди, според Уредбата за класификација на водите, не е определена вредност над максимално дозволена концентрација во ниту еден примерок. Сепак, според утврдената концентрација, може да се направи градација на површинските води од II до IV. Врз основа на концентрацијата на органохлорните пестициди во испитуваните месеци, може да се заклучи дека најзагаден е локалитетот 7 (Голема Река), а најнезагадени се локалитетите: (1) Село Стење и (6) село Д. Дупени. Во 53% од анализирани примероци утврдено е присуство на p,p'DDT. Односот помеѓу p,p'DDE и p,p'DDD укажуваат на перзистентноста на пестицидот p,p'DDT.

Врз основа на добиените резултати потребно е да се превземат соодветни мерки, како и органичена примена на пестицидите во периодот кога се очекува нивна највисока концентрација.

ЛИТЕРАТУРА

- Ahad K., Ahmed I., Muhhemmed, Aziz S., U.K.Baloach, Determination of pesticides residues in ground water of Mardan division, Pakistan. *J. water (South Afrika)*; 26(3):409-412, 2000
- Darko G., Akato O., Oppong C., Persistent organochlorine pesticides residues in fish, sediment and water from Lake Bosomtwi, Ghana, *Chemosphere*. 2008 May; 72(1):21-4 Epub 2008 Apr 7
- Kasozi G.N., Kiremire B.T., Budenyi F.W.B., Kirsch N.H., Organochlorine Residues in water and fish samples from Lake Viktorija, *Jouran of Chromatography Uganda*, 2006
- Nardeli V., Palmero C., Centozo C., *Journal of Chromatography A* 1034-33, 2004
- Sorensen, R.B., Bruggemann L., Carisen L., Mogensen B.B., Kreuger J., Pundez S., Analysis of monitoring data of pesticide residues in surface water. *Environmental Toxicol. Chem.*; 22(3); 661-670, 2003

LABORATORY BIOMARKERS IN CARDIOVASCULAR MEDICINE

Hiljadnikova Bajro M., Kadifkova Panovska T.

Faculty of Pharmacy, University "Ss. Cyril and Methodius", Skopje, Republic of Macedonia

Cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of disability and death in industrialized world and most of the developing countries. Hence, evaluation of cardiovascular risk factors in the population, early diagnosis of the disease and appropriate therapeutic management are becoming excessively attractive healthcare issue increasing the interest for development of new biomarkers of CVD(1).

An ideal biomarker should comply many pre-analytical, analytical and post-analytical criteria, including in vivo and in vitro stability, analytical sensitivity, reproducibility and accuracy, easy performance, international standardization, favorable cost-benefit ratio, good diagnostic and prognostic accuracy, low biological variation with strictly defined reference range, and good acceptance by the patient. The primary feature of a good marker is enhancing the clinician's ability to manage the patient in an optimal manner (2), but biomarkers should be accepted in the clinical practice only if possessing efficiency and effectiveness according to EBLM principles (3)

Until now, only several markers apart from the classic risk factors such as dyslipidemia, insulin resistance, diabetes and estrogenous status, have proved clinical utility to be applied in regular clinical practice. Cardiac specific troponins are current standard biomarkers in diagnosing acute myocardial infarction and risk stratification of patients with acute coronary syndromes. Brain-type natriuretic peptides aid the diagnosis of acute and chronic heart failure, have proved prognostic value and might help in targeting therapies. Large trials have confirmed the prognostic impact of C-reactive protein and its role in identification of healthy individuals who could benefit from intensive statin therapy. Creatine phosphokinase MB is a marker with well established prognostic, diagnostic and therapeutic value. Exclusion of deep vein thrombosis and pulmonary embolism is assisted by D-dimer testing. Myeloperoxidase, lipoprotein-associated phospholipase A2, Interleukin-6, matrix-metalloproteinase-9, copeptin, growth differentiation factor are only a few of the many biomarkers emerging with a potential of clinical utility (4,5).

Application of molecular biology techniques in identification of cardiovascular biomarkers is becoming interesting but is mostly limited due to the multifactor etiology of the CVDs involving environmental and behavioral impact on the genetic background. Still, early research has resulted in identifying main genes associated with the familial cardiomyopathies and arrhythmias, and genes described in association

with an increased risk of cardiovascular disease. Further to this the multifactor etiology of these diseases urges the need of establishing a genomic/proteomic profile associated with a CVD instead of single locus genetic analysis (6).

Serious efforts are made towards application of mass spectrometry for identification of proteins/processes as biomarkers of CVDs, and development of new markers in this field are expected soon (7).

In conclusion, until recently the clinical cardiologists could choose from a very few short list of non-specific laboratory tests in management of patients with CVD. The continuous progress in development of new assays including molecular biology and genetic tests, has improved both, the diagnostic accuracy and the prognostic stratification of patients as well as the patient outcome. Still, there is much to go until discovery of an "ideal" cardiovascular biomarker, if possible at all.

REFERENCES

1. Jaffe AS, Babuin L, Apple FS. Biomarkers in acute cardiac disease: the present and the future. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Jul 4;48(1):1-11. Epub 2006 Jun 12.
2. Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation.* 2006 May 16;113(19):2335-62.
3. Marshall DA, O'Brien BJ. Economic evaluation of diagnostic tests. In: Price PC, Christensen RH, editors. Evidence-based laboratory medicine – from principles to outcomes. Washington DC: Hochholzer W, Morrow DA, Giugliano RP. Novel biomarkers in cardiovascular disease: update 2010. *Am Heart J.* 2010 Oct;160(4):583-94
4. Sundström J. Myocardial biomarkers for prediction of cardiovascular disease. *Dis Markers.* 2009;26(5-6):235-46.
5. Hochholzer W, Morrow DA, Giugliano RP. Novel biomarkers in cardiovascular disease: update 2010. *Am Heart J.* 2010 Oct;160(4):583-94
6. Vittorini S, Clerico A. Cardiovascular biomarkers: increasing impact of laboratory medicine in cardiology practice. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46(6):748-63.
7. Suzuki T. Cardiovascular diagnostic biomarkers: the past, present and future. *Circ J.* 2009 May;73(5):806-9. Epub 2009 Mar 27.

Освен класичните ризик фактори како дислипидемија, инсулин-резистенција, diabetes mellitus и естрогенскиот статус, до денес само неколку маркери ја докажале својата клиничка ефикасност за да најдат примена во редовната клиничка пракса. Кардијалните специфични тропонини во моментот се стандардни биомаркери за дијагноза на акутен миокарден инфаркт и субкласификација на пациентите со акутни коронарни синдроми. Натриуретичните пептиди од мозочен тип асистираат во дијагностицирање на акутна и хронична срцева слабост, имаат потврдено прогностичко значење и може да помогнат во таргетирање на терапијата. Обемни студии го имаат потврдено прогностичкото значење на Ц-реактивниот протеин и неговата улога во идентификација на здрави индивидуи кои би имале корист од интензивна терапија со статини. Креатин фосфокиназата МБ претставува маркер со добро дефинирана прогностичка, дијагностичка и терапевтска вредност. Тестот за Д-димери помага во исклучување на длабока венска тромбоза и пулмонална емболија. Миелопероксидазата, липопротеин-асоцираната фосфолипаза А2, Интерлеукин-6, матрикс-металопротеиназата -9, копептинот, и факторот за диференцијација на раст се само неколку од многуте биомаркери кои се појавуваат со потенцијал за клиничка употреба (4,5).

Во идентификација на нови кардиоваскуларни маркери, се поинтересна станува апликацијата на техники од молекуларната биологија, но таа е во главно лимитирана од мултифакторијалната етиологија на КВЗ која вклучува влијание на надворешната средина и животните навики врз генетската предиспозиција. Сепак, иницијалните истражувања досега успеаа да ги идентификуваат главните гени поврзани со фамилијарните кардиомиопатии и аритмии, како и гените поврзани со зголемен ризик за кардиоваскуларна болест. Покрај ова, мултифакторијалната етиологија на овие заболувања ја наметнува потребата од дефинирање на геномскиот/протеомскиот профил карактеристичен за КВЗ наместо едноставната генетска анализа на поединечни локуси (6).

Сериозни напори се вложуваат во апликација на масената спектрометрија за идентификација на протеини/процеси како биомаркери за КВЗ и наскоро се очекува воведување на нови маркери во оваа област (7).

Може да се заклучи дека се до неодамна клиничките кардиолози имаа на располагање многу мал избор на неспецифични лабораториски тестови за третман на пациенти со КВЗ. Континуираниот напредок во развој на нови тестови вклучувајќи ги молекуларните и генетските тестови ја усоврши дијагностичката прецизност, овозможи прогностичка субкласификација на пациентите и придонесе за подобрување на клиничкиот исход кај овие заболувања. Сепак, мора да признаеме дека сеуште треба да се работи за да дојдеме до откривање на "идеален" кардиоваскуларен биомаркер, доколку е тоа воопшто можно.

ЛИТЕРАТУРА


1. Jaffe AS, Babuin L, Apple FS. Biomarkers in acute cardiac disease: the present and the future. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Jul 4;48(1):1-11. Epub 2006 Jun 12.
2. Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation.* 2006 May 16;113(19):2335-62.
3. Marshall DA, O'Brien BJ. Economic evaluation of diagnostic tests. In: Price PC, Christensen RH, editors. Evidence-based laboratory medicine – from principles to outcomes. Washington DC: Hochholzer W, Morrow DA, Giugliano RP. Novel biomarkers in cardiovascular disease: update 2010. *Am Heart J.* 2010 Oct;160(4):583-94
4. Sundström J. Myocardial biomarkers for prediction of cardiovascular disease. *Dis Markers.* 2009;26(5-6):235-46.
5. Hochholzer W, Morrow DA, Giugliano RP. Novel biomarkers in cardiovascular disease: update 2010. *Am Heart J.* 2010 Oct;160(4):583-94
6. Vittorini S, Clerico A. Cardiovascular biomarkers: increasing impact of laboratory medicine in cardiology practice. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46(6):748-63.
7. Suzuki T. Cardiovascular diagnostic biomarkers: the past, present and future. *Circ J.* 2009 May;73(5):806-9. Epub 2009 Mar 27.

ЛАБОРАТОРИСКИ БИОМАРКЕРИ ВО КАРДИОВАСКУЛАРНАТА МЕДИЦИНА

Хиљадникова Бајро М., Кадифкова Пановска Т.

*Фармацевтски Факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј" Скопје,
Република Македонија*

Кардиоваскуларните заболувања (КВЗ) се главна причина за смрт и инвалидитет во индустријализираниот свет и повеќето од земјите во развој. Оттука, евалуацијата на кардиоваскуларните ризик фактори кај популацијата, рана дијагноза и соодветен терапевтски третман на КВЗ стануваат особено атрактивен здравствен предизвик зголемувајќи го интересот за развој на нови биомаркери за КВЗ (1). Идеален биомаркер треба да исполнува бројни пред-аналитички, аналитички и пост-аналитички критериуми, вклучувајќи стабилност во in vivo и in vitro услови, аналитичка сензитивност, репродукцибилност и точност, лесна изведба, интернационална стандардизираност, поволен сооднос меѓу цената и полезноста, добра дијагностичка и прогностичка прецизност, ниска биолошка варијабилност со точно дефиниран референтен интервал и добра прифатеност од страна на пациентите. Примарна карактеристика на добар маркер е проширување на можностите на клиничарот за оптимален третман на пациентите (2), сепак биомаркерите треба да бидат прифатени во клиничката пракса само доколку поседуваат ефикасност и ефективност според принципите на лабораториска медицина базирана на докази (3).



**КЛИНИЧКА БИОХЕМИЈА /
ТОКСИКОЛОГИЈА /
ХРАНА И ИСХРАНА**
постер презентациии

**CLINICAL BIOCHEMISTRY /
TOXICOLOGY /
FOOD AND NUTRITION**
poster presentations

DETERMINATION OF TOTAL LEAD CONTENT IN HERBAL DRUGS GROWN ON DIFFERENT LOCATIONS

Biljana Kaličanin, Ivana Arsić,
Dragan Velimirović, Sonja Naumović

University of Niš, Faculty of Medicine, Department of Pharmacy,
Bulevar dr Zorana Đinđića 81, 18000 Niš, Serbia

Herbal drugs, and galenic forms (decocts or extracts) obtained from these natural drugs are widely consumed as home remedies and raw materials for the pharmaceutical industry. The use of medical plants in both crude and prepared forms has greatly increased, and although herbal remedies are often perceived as being natural and therefore safe, they are not free from adverse effects. Various reports have discussed the potential health implications of trace metals in herbal drugs, since the herbal bush is known to accumulate them. One of the major reasons to monitor levels of toxic metals in medicinal plants is that the contamination of the general environment has increased. The sources of this environmental pollution are quite varied, ranging from industrial and traffic emissions to the use of purification mud and agricultural expedients such as cadmium containing dung, organic mercury fungicides and the insecticide lead arsenate. Medicinal plants are normally grown in highly acidic soils, where lead is potentially more bioavailable for root uptake. Furthermore, these plants have a large leaf area, a characteristic that is conducive to foliar deposition and uptake of lead from the atmosphere. Lead present in plants can lead to morphological and physiological disorders in the plant, which can manifest as a reduction in leaf area, reduction the growth of plants, as well as negative effects on root system development. Using herbal drugs and their products, present lead can enter the human body. The presence of this toxic metal, even in trace amounts, poses a potential treat to human health due to its toxic and cumulative effects.

The goal of this study was the assessment of the total content of lead in some herbal drugs that were cultivated in two different locations. The total content of lead was determined in samples which were mineralized by dry digestion method. The presence of lead in the samples was detected using potentiometric stripping analysis (PSA), known as high sensitive micro-analytical technique.

The total content of lead in the analyzed samples of herbal drugs *Chamimillae flos*, *Urticae folium*, *Menthae folium* and *Basilici herba*, which were grown at the site near the industrial zone, was 1.34 µg/g, 1.66 µg/g, 1.68 µg/g and 2.52 µg/g, respectively. The total content of this toxic metal in the analyzed samples of herbal drugs that are cultivated at the site from rural areas was only detected in *Urticae folium* and it was 0.053 µg/g.

Based on results in this study, it can be concluded that herbal drugs contain a certain amount of lead and that its content depends on the location at which the plant species grown. Proximity to industrial areas contributes significantly to the increase of lead content in herbal drugs. The content of lead that was detected in this study is under the permitted limits, but bearing in mind its cumulative and toxic effect on human health, it is necessary to monitor and detect content of this metal in herbal drugs.

REFERENCES

- Arpadjan S, Celik G, Taskesen S, Gücer S. *Arsenic, cadmium and lead in medicinal herbs and their fractionation*. Food and Chemical Toxicology 2008; 48:2871-2875.
Gomez R. M, Cerutti S, Sombra L, Silva F. M, Martinez D. L. *Determination of heavy*

- metals for the quality control in argentinian herbal medicines by ETAAS and ICP-OES*. Food and Chemical Toxicology 2007; 45:1060-1064.
Caldas D. E, Machado L. L. *Cadmium, mercury and lead in medicinal herbs in Brazil*. Food and Chemical Toxicology 2004; 42:599-603.
Kaličanin B. M, Velimirović D. *Teški metali u različitim biljnim vrstama kao posledica zagađenja životne sredine*. Ecologica 2008; 15:93-100.
Karak T, Bhagat R. M. *Trace elements in tea leaves, mede tea and tea infusion: a review*. Food Research International 2010; 43: 2234-2252.
Chong Wei J, You Feng H, Kai Z. *Lead contamination in tea lives and non-edaphic factors affecting it*. Chemosphere 2005; 61:726-732

DETERMINATION OF AFLATOXINS IN GRANULAR FOOD WITH CHARM II ANALYZER

Dona Trombeva¹, Elizabeta Petkovska - Popovska²

¹Clinical Hospital – Bitola,

²Institute for Health Protection - Bitola

The worldwide contamination of foods with mycotoxins is a significant problem. Mycotoxins are toxic secondary metabolites of some mould species. Aflatoxins are a group of mycotoxins with great agro-economic importance. *Aspergillus flavus* is mushroom which produces toxin which is called Aflatoxin. It is found in peanuts, corn, wheat, soya, rice, walnuts and others granular food. B1, B2, G1, G2, M1 and M2 are most frequent aflatoxins. In human food is frequently present B1 and rarely B2, G1 and G2. In the production of aflatoxins affect a lot of factors like wetness, relative wetness, temperature and weather. Charm II aflatoxin test is a chemical method. We performed five measurements on 200 different products. The presence of aflatoxins in granular food is determined by Law of basic needs for security of food for which the allowed limit are to 2ppt. We used for analysis salted, unsalted, roasted, unroasted hazelnuts, peanuts, almonds, pumpkin seeds, sesamy seeds, sunflower, pistacio, walnuts, Indian nuts and coffee. A standard curve is first performed with different concentrations 12,5ppt, 25ppt, and 50ppt. We presence of aflatoxins in 200 products of granular food in a period of one year. From all products only on four we found aflatoxins. Our conclusion in determination of aflatoxins is of great importance going by that they possess teratogenic, cancerogenic and mutagenic properties. Of great advantage is the use of the Method Charm II test, because the determination of aflatoxins is very short, we used a small amount for analysis and we used ready prepared reagents and blister tablets.

REFERENCES

1. De Koe W. (1993). Moulds and Toxins in International Perspective. Cereal Science and Technology. Impact on Changing Africa, ed. Taylor J.R.N., Randal P.R., Viljoen V.H., Pretoria, 807-822
2. Pittet A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds-an updated review. Revue Med. Vet. 149, 6, 479-492
3. Kurtzman C.P., Horn B. W., Hesseltine C.W. (1987). *Aspergillus nominus*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaril*. Antonie van Leeuwenhoek, 53, 147-158
4. Gqaleni N. et al. (1997). Effects on temperature, water activity and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar. Appl. Environ. Microbiol. 63, 1048-1053
5. Allcroft R., Carnaghan R.B.A (1962). Groundnut toxicity of *Aspergillus Flavus* toxin (aflatoxin) in animal products. Vet. Rec. 74, 863-4
6. Moss M.O. (2002). Risk assessment for aflatoxin in foodstuffs. International Biodegradation and Biodegradation 50, 3-4, 137-142
7. Council for Agricultural Science and Technology CAST (1989). Mycotoxins. Economic health and risks. Task Force Report 116, Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa.
8. Hussein S. H., Brasel J.M. (2001). Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on

- humans and animals. *Toxicology* 167, 2, 101-134
 9. Creppy E.E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.* 127, 1-3, 19-26
 10. Atroshi F. et al. (2002). Antioxidant nutrients and mycotoxins. *Toxicology* 180, 2, 151-167
 11. Soliman K.M., Badaea R. I. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem. Toxicol.* 40, 11, 1669-1675.
 12. Bata A., Laszity R. (1999). Detoxification of mycotoxin contaminated food and feed by microorganisms. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 6-7, 223-228.

ОДРЕДУВАЊЕ НА АФЛАТОКСИНИ ВО ЗРНЕСТА ХРАНА СО CHARM II ANALYZER

Дона Тромбева¹, Елизабета Петковска-Поповска²

¹Клиничка болница-Битола,

²Завод за здравствена заштита-Битола

Контаминацијата на животните намирници со микотоксини претставува значаен проблем во многу земји. Микотоксините се токсични секундарни метаболити на поделни врсти плесни. Афлатоксините се група на микотоксини кои од агро-економски аспект имаат огромно значење. *Aspergillus flavus* е габа која произведува токсин наречен афлатоксин. Таа е најдена во кикирики, пченка, пченица, соја, ориз, ореви, кафе и др. зрнеста храна. Постојат афлатоксини B1, B2, G1, G2, M1 и M2 но најчесто застапени во човечка храна е B1, а поретко B2, G1 и G2. Врз создавањето на афлатоксините влијаат повеќе фактори како мувла, влага, влажност, температура и време. Методата за одредување на афлатоксини со **Charm II aflatoxin test** е хемиска метода. Присуството на афлатоксини се испитува по Правилник за општи барања за безбедност на храна по кој се дозволени граници до 2ppt. Користени се за анализа солени, несолени, печени и непечени 200 врсти на зрнеста храна. (лешници, кикирики, бадеми, семки, сусам, сончоглед, фстаји, ореви, индиски ореви и кафе. Вршени се по пет мерања за секоја врста зрнеста храна во период од една година. Правена е прво стандардна крива со стандард aflatoxin M1, како позитивна контрола во три различни концентрации 12,5 ppt, 25 ppt и 50 ppt. Од сите мерења на 200 производи само на 4 позитивно се најдени афлатоксини. Одредувањето на афлатоксини е од големо значење поаѓајќи од тоа дека тие имаат тератогено, канцерогено и мутагено дејство. Заклучивме дека употребата на оваа метода има голема предност поради времетраењето на детекција кое е многу кратко, количеството за анализа е мало, и се користат готови реагенси и блистер таблети.

ЛИТЕРАТУРА

- De Koe W. (1993). Moulds and Toxins in International Perspective. *Cereal Science and Technology. Impact on Changing Africa*, ed. Taylor J.R.N., Randal P.R., Viljoen V.H., Pretoria, 807-822
- Pittet A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds-an updated review. *Revue Med.Vet.* 149, 6, 479-492
- Kurtzman C.P., Horn B. W., Hesseltine C.W. (1987). *Aspergillus nominus*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaril*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53, 147-158
- Gqaleni N. et al. (1997). Effects on temperature, water activity and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1048-1053
- Allcroft R., Carnaghan R.B.A (1962). Groundnut toxicity of *Aspergillus Flavus* toxin (aflatoxin) in animal products. *Vet. Rec.* 74, 863-4
- Moss M.O. (2002). Risk assessment for aflatoxin in foodstuffs. *International Biodegradation and Biodegradation* 50, 3-4, 137-142
- Council for Agricultural Science and Technology CAST (1989). *Mycotoxins. Economic health and risks. Task Force Report 116*, Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa.

GSTP1, GSTM1 AND GSTT1 GENOTYPES AND SERUM GST IN MALE COPD

Žuntar Irena¹, Petlevski Roberta¹, Dodig Slavica²,
Popović-Grle Sanja³

¹University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia,

²Paediatric Hospital Srebrnjak, the Referral Centre for Clinical Paediatric Allergology operating under the wing of the Ministry of Health and Social Welfare, Zagreb, Croatia, ³University Hospital for Pulmonary Diseases Jordanovac, Zagreb, Croatia

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a progressive lung disease characterized by breathing difficulties, wheezing and chronic cough and defined by expiratory airflow (FEV1) limitation. It has generally been accepted that cigarette smoking represents the most important risk factor favouring COPD onset. The fact that only 10% to 20% of chronic smokers develop severe COPD-related pulmonary function impairment indicates the presence of genetic predisposing factors involved into COPD pathogenesis.

The aim of the study was to determine the genotype distribution for the GSTP1 A313G exon 5 polymorphism, GSTP1 C341T exon 6 polymorphism and deletions in GSTM1 and GSTT1 genes in samples of 90 subjects (COPD and controls) and to investigate the association between GST polymorphisms and COPD. Serum GST activity was evaluated as a distinguishable biochemical marker of the disease presence/absence. Also, in order to confirm the presence of an inflammatory process in COPD subjects, serum alpha-1-antitrypsin (AAT) concentration was determined. Lactate dehydrogenase (LDH) activity was determined in order to test for an increased anaerobic metabolism in COPD.

The A313G and C341T GSTP1 genotypes were determined by PCR-RFLP, GSTM1 and GSTT1 deletions by a multiplex PCR, GST activity using spectrophotometric method, LDH and AAT by standard methods in older male Caucasian Croats with stable COPD (n=30) and sex/age matched controls (n=60; non-smokers, ex-smokers, and smokers).

The differences in GSTP1 exon 5, GSTP1 exon 6 and allele frequencies (A/G and C/T) found in the control and COPD group were statistically significant (p<0.05). Of statistical significance, CC/TT odds ratio equalled to 10.000 (p<0.05). The frequency of null GSTM1, null GSTT1 and the two lacked statistical significance (p>0.05). Total GST did not statistically differ either between the controls and COPD patients, or across smoking-based subgroups. The differences in total AAT concentrations and LDH activities seen across the two studied groups reached statistical significance (p<0.05). A statistically significant differences were obtained for AAT (control non-smokers vs. the entire COPD arm, p<0.05) and for LDH activity registered in the control vs. COPD non-smokers (p<0.05).

The results of serum AAT concentration confirmed the existence of inflammation and elevated LDH activity chronic hypoxia in stable male COPD patients.

Our study showed AA and CC genotypes to be COPD-protective, and AG/GG and CT/TT to be COPD-risky. Null GSTM1, null GSTT1 and the two were not proven disease-associated. Serum GST and smoking status were proven mutually independent. Serum GST lacks sufficient power to discriminate between stable COPD and COPD-free individuals.

REFERENCES

1. Hirvonen A. Gene-environmental interactions in chronic pulmonary diseases. *Mut Res* 2009;667:132-141.
2. Žuntar I, Kalanj-Bognar S, Topić E, Petlevski R, Štefanović M, Demarin V. The glutathione S-transferase polymorphisms in a control population and in Alzheimer's disease patients. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:334-339.
3. Arruda VR, Grignoli CE, Goncalves MS et al. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *Clin Genet* 1998;54:210-214.
4. Haddous M, Vincent-Viry M, Visvikis S, Siest G. Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferase activity. *Clin Chim Acta* 2002;326:131-142.

CHARACTERISTICS OF THE WATER IN LAKE OHRID AND BILJANA SPRINGS

Robertina Tomevska¹, Vera Novevska²,
Lidija Petrushevska-Tozi³

¹PHO-Pharmacy "Nelifarm", Ohrid

²PSI Hydrobiological Institute - Ohrid

³Faculty of Pharmacy - Skopje

Water, as a habitat, stands for the basis of life. It accounts for ¾ of the planet's surface, 0.5% of which belonging to freshwater. An abundance of diverse biota has developed in water adjusting to its conditions. Water as a substance features certain physicochemical characteristics applicable for the organisms living in it. These arise as bioindicators of the quality of the water they inhabit.

The beautiful Lake Ohrid – "The Macedonian Freshwater Sea" is situated in the utmost southwestern part of the Republic of Macedonia, westerly of the intersection at a 41° latitude and 21 degrees longitude, in a tectonically created valley. Its blue waters encompass an area of 358 km², and the transparency is greatest at 288.7m depth. Its vast coast length ranges to 87 km, with maximum length of 30 km, whereas the maximum width reaches to 15 km.

This work has analysed the physicochemical characteristics of Lake Ohrid pelagial water in order to obtain data for its quality during the investigated period (June, July, September, October and November 2009, as well as January, March and April 2010). Facultative oligotrophic bacteria have been analysed as bioindicators and according to their number a water categorization has been performed for the respective region in the course of the investigation period.

Water samples collected from Biljana Springs outflow have been concurrently analysed with those sampled from an end user of the Ohrid municipal watersupply. The data have been processed in accordance with the Regulations for Water Safety – Official Gazette of the Republic of Macedonia 46/2008.

The obtained results regarding the physicochemical and biological parameters, such as oxygen from 5,76 to 13,59 mg.lit⁻¹, total phosphorus ranging from 3,35 to 11,1 µg/lit⁻¹, KMnO₄ consumption from 1,88 to 4,68 mg.lit⁻¹, guide to the conclusion that Lake Ohrid pelagial water displays an oligotrophic character. The number of the present organotrophic bacteria ranges from 152 bac.ml⁻¹ water to 12 992 bac.ml⁻¹ water, implying of I and II category of water according to the limnological criteria.

The comparison with the long-term data of the investigations in water of the coastal (littoral) region has shown that negative anthropogenic impact is still present and reflected negatively in the water in this

region. This impact has fortunately not been yet manifested in the pelagial region, which implies that Lake Ohrid water is safe for consumption, recreation and fishing.

The results of the analysed physicochemical and microbiological parameters in Biljana Springs outflow in the course of the investigated period showed that the water does not meet the regulations for water safety according to the Official Gazette of Republic of Macedonia 46/2008, due to water being microbiologically unsafe, whereas municipal public supply water is safe for consumption according to the same regulations.

REFERENCES

- Ановски, Т., Наумовски, Ј., Качурков (1980): Прилог кон студијата за утврдување на потеклото на водите од изворите кај Св. Наум-Охридско Езеро
Bether, G., 1953: Praktikum za hemisko ispituvanje voda. Hig. Inst. Srbije br. 3 Beograd, str. 78
Biddanda, B., Ogdahl, M., and Cocher, J., (2001): Dominance of bacterial metabolism in oligotrophic relative to eutrophic waters. *Limnol. Oceanogr.*, 46(3), p: 730-739
Cvijic, J., 1911: Osnove za geografiju i geologiju Makedonije i stare Srbije. SKA. Beograd kw. III: 268-1270
Matavulj, M. (1986): Nespecificne fosfomonoesterhidrolaze mikroorganizma i njihov znacaj u kruzenu fosfora u akvaticnim stanistama. Doktorska disertacija, Sveuciliste u Zagrebu, Prirodoslovno-matematicki fakultet.
Новеvsка В., 2002: Органотрофните бактерии како показател на еколошкиот статус на охридското езеро, Докторска дисертација, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Природно-математички факултет, Институт за биологија Скопје.
Tumpling, W., 1969: Zur Klassifizierung der Wassererschaffenheit aus Biologischer Sicht. *Wiss. Z. Univ. Rostock*, 18: 793-798
Welch, 1948: *Limnological methods*. Blakiston Co. Philadelphia, p. 38
Новеvsка, В., Оцевски, Б., Митиќ, В., 1986: Некои показатели за загадувањето на водите во реонот на Охридскиот Залив. Советување за заштита на човековата средина при СО Охрид.
Petrovic, G., 1975: Hydrochemical study of Lake Ohrid in respect of his metabolism. *Зборник на работите, Хидробиолошки завод Охрид* 159(3)(84): 1-70

КАРАКТЕРИСТИКИ НА ВОДАТА ОД ОХРИДСКОТО ЕЗЕРО И БИЛЈАНИНИТЕ ИЗВОРИ

Робертина Томевска¹, Вера Новевска²,
Лидија Петрушевска-Този³

¹ПЗУ-Аптека „Нелифарм“, Охрид

²ЈНУ Хидробиолошки Институт - Охрид

³Фармацевтски Факултет - Скопје

Водата како животна средина, претставува основа на животот. Таа зафаќа ¾ од земјината површина, од кои само 0,5% припаѓаат на копнените води. Во водата е развиен буен разновиден жив свет кој се прилагодил на условите. водата како супстанца се одликува со физичко-хемиски особини на кои се прилагодиле и живите организми кои живеат во неа. Тие претставуваат биоиндикатори за квалитетот на водата во која живеат.

На крајниот југозападен дел од Република Македонија, западно од пресекот на 41° с.г.ш и 21° и.г.д. во тектонски настаната котлина, се наоѓа „македонското слатководно море“, – прекрасното Охридско Езеро. Своео синило го распрослало на површина од 358 км², а неговата бистрина е до најголема длабочина од 288,7 м. Неговиот разгранет брег зафаќа должина од околу 87 км, најголемата должина изнесува околу 30 км додека пак најголемата широчина 15 км. Во овој труд анализирани се физичко-хемиските особини на водата

од пелагијалниот регион на Охридското Езеро, со цел да се добијат податоци за нејзиниот квалитет во истражуваниот период (јуни, јули, септември, октомври и ноември-2009 год. и јануари, март и април 2010 год.). Факултативно олиготрофните бактерии се анализирани како биоиндикатори и според нивната бројност е направена класификација на водата од испитуваниот регион во периодот на истражување.

Паралелно се анализирани примероци на вода од преливот кај Билјанини извори и од краен потрошувач на водоводната мрежа од градски водовод Охрид. Податоците се обработени согласно методите предвидени со Правилникот за безбедност на вода Сл.весник на Р.Македонија 46/2008.

Добиените резултати од физичко-хемиските и биолошките параметри; како што се застапеноста на кислород од 5,76 до 13,59 mg.lit⁻¹, вкупниот фосфор од 3,35 до 11,1 µg/lit⁻¹, потрошувачката на KMnO₄ од 1,88 до 4,68 mg.lit⁻¹, дојдовме до заклучок дека водата од Охридското Езеро, во пелагијалниот регион се одликува со олиготрофни карактеристики. Бројната застапеност на органотрофните бактерии се движи од 152 bac.ml.⁻¹ вода до 12 992 bac.ml.⁻¹ вода, која според лимнолошките критериуми укажува на вода со особини од I и II класа.

Споредбата со литературните податоци од долгогодишните истражувања на водата од крајбрежниот (литорален) регион покажа дека антропогеното негативно влијание е присутно и се рефлектира негативно на водата од овој регион. За среќа ова влијание се уште не е манифестно во пелагијалниот регион, што значи водата од Охридското Езеро ги задоволува условите на вода која се користи за рекреација, риболов, односно е безбедна по животот на нејзините корисници.

Резултатите од анализите на физичко-хемиските и микробиолошките параметри на водата од преливот кај Билјанини извори во истражуваниот период, покажаа дека водата согласно Правилникот за безбедност на вода Сл.весник на Р.Македонија 46/2008, не одговара за директна употреба поради микробиолошка неисправност, додека водата од градскиот водовод (водоводната мрежа) одговара за употреба согласно истиот Правилник.

ЛИТЕРАТУРА

- Ановски, Т., Наумовски, Ј., Качурков (1980): Прилог кон студијата за утврдување на потеклото на водите од изворите кај Св. Наум-Охридско Езеро
Bether, G., 1953: Praktikum za hemisko ispituvanje voda. Hig. Inst. Srbije br. 3 Beograd, str. 78
Biddanda, B., Ogdahl, M., and Cother, J., (2001): Dominance of bacterial metabolism in oligotrophic relative to eutrophic waters. *Limnol. Oceanogr.*, 46(3), p: 730-739
Свијиц, Ј., 1911: Основе за географију и геологију Македоније и старе Србије. SKA. Beograd kv. III: 268-1270
Matavulj, M. (1986): Nespecificne fosfomonoesterhidrolaze mikroorganizma i njihov znacaj u kruzenu fosfora u akvaticnim stanistama. Doktorska disertacija, Sveuciliste u Zagrebu, Prirodoslovno-matematicki fakultet.
Новевска, В., 2002: Органотрофните бактерии како показател на еколошкиот статус на охридското езеро, Докторска дисертација, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Природно-математички факултет, Институт за биологија Скопје.
Tumpling, W., 1969: Zur Klassifizierung der Wassererschaffenheit aus Biologischer Sicht. *Wiss. Z. Univ. Rostock*, 18: 793-798
Welch, 1948: *Limnological methods*. Blakiston Co. Philadelphia, p. 38
Новевска, В., Оцевски, Б., Митиќ, В., 1986: Некои показатели за загадувањето на водите во реонот на Охридскиот Залив. Советување за заштита на човековата средина при СО Охрид.
Petrovic, G., 1975: Hydrochemical study of Lake ohrid in respect of his metabolism. Зборник на работите, Хидробиолошки завод Охрид 159(3)(84): 1-70

DETERMINATION OF ALUMINUM CONTENT IN DRINKING WATERS BY GFAAS

Suzana Angelova, Desa Jakimova, Gligor Manov

Centre for Public Health Kumanovo Macedonia

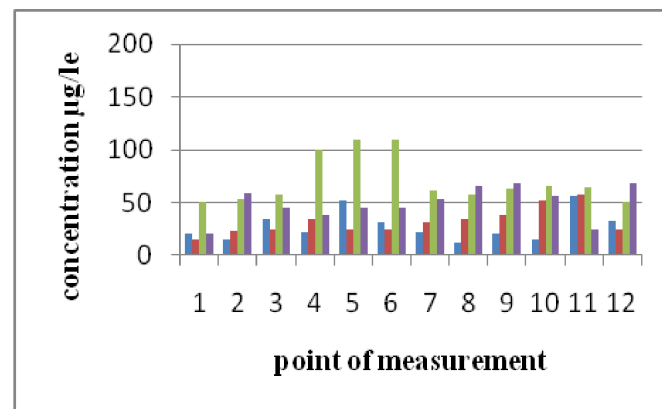
Aluminium salts such as Al sulphate, are used extensively as a coagulants in drinking water treatment to enhance the removal of particulate, colloidal and dissolved substances. The presence of Al in drinking water has given rise to discussion on possible health effects, because of its suspected connection with Alzheimer's disease or dialysis encephalopathy.

The main objective of this work is to develop a method for determination of Aluminum in drinking waters from public waters supplies.

The drinking waters were sampled from public utilities using acid washed polypropylene sampling bottles and conserved in the dark at 4°C before analysis. Samples were acidified at pH<1 using concentrated HNO₃ (Merck Suprapur™). In water samples, Al analyses were performed directly using graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS), employing pyrolytically coated graphite tubes and background correction (Perkin Elmer AAnalyst 600). Standard Aluminum solutions (10, 30 and 50 µg/l) were prepared by diluting of a commercial Al solution (1000 mg/l Al). Magnesium nitrat (0.1%) was used as a matrix modifier for the measurement of Al by GFAAS. The linear range was 0-50 µg/l, the correlation coefficient 0.9995.

The data reported were obtained from a drinking water quality monitoring program carried out on twelve points of public waters supplies of the municipality Kumanovo.

In analysed samples, aluminium values ranged from 12 to 109 µg/l in drinking water. *Figure 1.*



WHO have established a threshold value of 200 µg/l Al for drinking water. Also, all these results are below the MCL in accordance with our directive.

This method is simple, rapid and accurate and it is suitable for daily detection of large number of samples determination.

ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА СОДРЖИНА НА АЛУМИНИУМ ВО ВОДА ЗА ПИЕЊЕ СО ГФААС

Сузана Ангелова, Деса Јакимова, Глигор Манов

Центар за Јавно здравје Куманово

Солите на алуминиум, како на пример Алуминиум сулфат, имаат широка примена при третман на водата за пиење, како коагуланти за да го засилат отстранувањето на суспендраните, колоидните и растворените субстанции. Присуството на Алуминиум во водата за пиење дава повод за дискусија за можните ефекти по здравје, поради неговата поврзаност со Алцхајмеровата болест или ренална енцефалопатија.

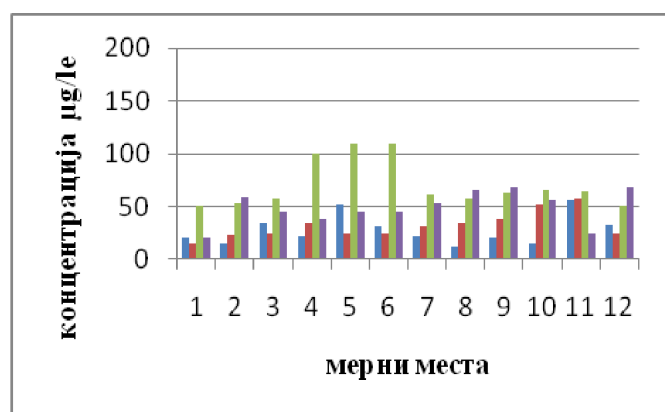
Главна цел на овој труд е да се разработи метод за определување на содржината на алуминиум во водата за пиење во водоводната мрежа.

Примероците на вода за анализа беа земени во полипропиленски шишиња, претходно третирани со 10% азотна киселина, и чувани на темно на +4°C до нивно анализирање. Примероците беа закиселени на pH<1 со примена на концентрирана HNO₃ (Merck Suprapur™). Во примероците на вода, определувањето на Алуминиум се изведува директно со примена на атомска апсорпциона спектрометрија со пиролизитички обложена графитна кивета и бекграунд корекција (PerkinElmer AAnalyst 600). Стандардните раствори на алуминиум со концентрација од 10, 30 и 50 µg/l беа приготвени со разредување на комерцијален раствор на алуминиум со концентрација од 1000 mg/l Al. 0.1% раствор на Магнезиум нитрат е употребен како матрикс модифаер. Линеарниот опсег е од 0-50 µg/l, со коефициент на корелација 0.9995.

Податоците за алуминиум се добиени при следење на водата за пиење од водоводната мрежа во општина Куманово.

Во примероците кои беа анализирани, вредноста на алуминиум се движи помеѓу 12 и 109 µg/l.

Фигура1.



Светската здравствена организација има востановено максимално дозволена концентрација во водите за пиење од 200 µg/l алуминиум. Исто така, резултатите добиени за алуминиум се под максимално дозволени концентрации и согласно нашите законски регулативи. Овој метод е едноставен, брз и точен и е погоден за секојдневно анализирање на голем број примероци.

ANTIOXIDANT STATUS AND DNA DAMAGE INDUCED BY HEAVY METALS IN *MATRICARIA RECUTITA L. (ASTERACEAE)*

Darinka Gjorgieva¹, Tatjana Kadifkova-Panovska²,
Tatjana Ruskovska¹

¹Faculty of Medical Sciences, Goce Delčev University, Štip, R. Macedonia,

²Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril and Methodius University, Skopje, R. Macedonia

Plants have been identified as sources of various phytochemicals, metabolites and active compounds, many of which possess important antioxidant activity [Kähkönen 1999]. Heavy metal stress in all living organisms often results in the production of reactive oxygen species (ROS), which are relatively reactive compared to molecular oxygen and thus potentially toxic [Van Assche and Clijsters, 1990]. Tolerance to heavy-metal stress has been correlated with efficient antioxidative defense system, as shown previously [Foyer et al., 1997; Dixit et al., 2001; Radić et al., 2009]. One of methods used to assess the total antioxidant capacity of plants is the ferric-reducing ability of plasma (FRAP) assay of Benzie and Strain (1996). Heavy metals also induce several cellular stress responses and damage to different cellular components such as membranes, proteins and DNA. DNA based techniques like Random amplified polymorphic DNA (RAPD) is used to evaluate the variation at the DNA sequence level and can clearly be shown when comparing DNA fingerprints from untreated and treated individuals to genotoxic agents [Savva D, 1998; Enan MR, 2006; Kekec et al., 2010]. The objective of the present study was to investigate whether exposure of selected plant (*Matricaria recutita L., Asteraceae*) to heavy metals can induce direct DNA damage and significant changes in endogenous total antioxidants level in the plant.

Samples from *Matricaria recutita L.* were sampled from two different areas, region with high industrial activity (city of Veles, around the lead-zinc plant) and naturally clear area, mountain Plačkovica. Leaves and flowers from the plants were analyzed by FRAP assay. Total antioxidant power of a freshly prepared, cooled, filtered infusion (0.5 g of dry leaves or flowers/50 mL of boiling, distilled water) of each sample was measured using the ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay [Benzie and Strain, 1996]. In the FRAP assay, reductants ("antioxidants") in the sample reduce Fe³⁺/tripyrilidyltriazine complex, present in stoichiometric excess, to the blue colored ferrous form, with an increase in absorbance at 595 nm. DNA extractions and amplifications were performed using REExtract-N-Amp Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich). Amplifications were performed in a DNA thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf) using 5 steps PCR-protocol [Enan MR, 2006].

Heavy metal toxicity is considered to induce production of ROS, which may result in significant alterations in cell structure and mutagenesis. DNA damage induced by heavy metals were observed in obtained RAPD profiles as disappearance and/or appearance of bands in comparison between plants from areas with different metal exposition. Metals, also, induced oxidative stress in *Matricaria recutita L.* plants, as evident from the decreased values for total antioxidants in µmol FeSO₄ L⁻¹ in samples collected from Veles area: *M. recutita* leaves - 2080; *M. recutita* flowers - 2822, compared to samples sampled from Plačkovica mountain as: *M. recutita* leaves - 3960 and *M. recutita* flowers - 2908. Plants developed different mechanisms enabling them to

cope with metal accumulation in tissue and ROS formation induced by metals presence. Tissue damage and additional DNA changes occurs when the capacity of antioxidative systems becomes lower than the amount of ROS generated [Sgherri et al., 2003; Kováčik and Bačkor, 2008].

In summary, this study has shown that heavy metals can induce antioxidant stress and DNA damage. Antioxidative system of *M. recutita* seems to be inducible by environmentally encountered heavy metals concentrations. Balance of different levels of plant metabolism is essential for eliminating toxic effects of metals and maintaining of structural and metabolic integrity. Thus, oxidative stress characterized by increased production of ROS could be an important mechanism of metal toxicity, though extensive research is yet needed at the molecular and subcellular levels in order to get a deeper insight into metal toxicity.

REFERENCES

- Benzie IFF, Strain JJ (1996). The ferric-reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76
- Dixit V, Pandey V, Shyam R (2001). Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *J Exp Bot* 52:1101-1109.
- Enan MR (2006). Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. *Biotechnol Appl Biochem* 43:147-154
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM (1997). Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. *Physiol Plant* 100:241-254
- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha J, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47:3954-3962
- Kecek G, Sakcali MS, Uzunur I (2010). Assessment of genotoxic effects of boron on wheat (*Triticum aestivum* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using RAPD analysis. *Bull Environ Contam Toxicol* 84(6):759-764
- Kováčik J, Bačkor M (2008). Oxidative status of *Matricaria chamomilla* plants related to cadmium and copper uptake. *Ecotoxicology* 17:471-479
- Radić S, Cvjetko P, Glavaš K, Roje V, Pevalek-Kozlina B, Pavlica M (2009). Oxidative stress and DNA damage in broad bean (*Vicia faba* L.) seedlings induced by thallium. *Environ Toxicol Chem* 28(1):189-196
- Sawa D (1998). Use of DNA fingerprinting to detect genotoxic effects. *Ecotoxicol Environ Safety* 41:103-106.
- Sgherri C, Cosi E, Navari-Izzo F (2003). Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiol Plant* 118:21-28
- Van Assche F, Clijsters H (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ* 13:195-206.

родни видови (ROS – reactive oxygen species), кои во споредба со молекуларниот кислород се многу пореактивни и затоа потенцијално токсични [Van Assche and Clijsters, 1990]. Толеранцијата кон стресот од тешки метали е во тесна корелација со ефикасниот ендоген антиоксидативен одбранбен систем кај растенијата [Foyer et al., 1997; Dixit et al., 2001; Radić et al., 2009]. Квантифицирањето на тоталниот антиоксидативен капацитет кај растенија, како мерка за одбранбениот систем кон одреден стрес, може да се врши со примена на FRAP методот (Ferric-reducing ability of plasma - FRAP) воведен од Benzie and Strain во 1996. Тешките метали, исто така можат да индуцираат и клеточни одговори на стресот и оштетување на различни клеточни структури како што се мембраните, протеините и DNA. DNA базираните техники, како што е случајно амплифицираната полиморфна DNA техника (RAPD), се користат за евалуација на варијациите во DNA секвенците. Овие промени можат јасно да биде потврдени со компарирање на DNA "отпечатоците" добиени од третирани и нетретирани примероци со генотоксични агенси [Savva D, 1998; Enan MR, 2006; Kecek et al., 2010].

Целта на студијата е да се испита и евалуира влијанието на експозијата на тешки метали кај избрано растение (*Matricaria recutita* L., *Asteraceae*) врз индуцирањето на DNA оштетување и промени во ендогениот антиоксидативен статус на растението.

Примероците од *Matricaria recutita* L. се собрани од две различни области: регион со висока индустриска активност (градот Велес, околу топилницата за олово и цинк) и контролни примероци од природно чист регион, планината Плачковица. Анализирани се листови и цветови од испитуваното растение со FRAP методот. Тоталниот антиоксидативен капацитет на свежо приготвени инфузи (0.5 g од исушената дрога/50 mL врела, дестилирана вода) од секој примерок е определен со FRAP метод [Benzie and Strain, 1996]. Евентуално присутните антиоксиданси во примерокот го редуцираат Fe³⁺/трипиридилтриазин комплексот присутен во стехиометриски однос, до сино обоена Fe²⁺ форма, што се рефлектира како повисока апсорбација при 595 nm. DNA екстракцијата и амплификацијата е направена со користење на REDEExtract-N-Amp Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich). Амплификацијата се изведува во DNA thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf) со користење на протокол во 5 чекори [Enan MR, 2006].

Утврдено е дека токсичноста на тешките метали е поврзана со продукција на ROS, што сигнификантно влијае врз клеточната структура и мутагенезата. DNA оштетувањето индуцирано од тешки метали е набљудувано со добиените RAPD профили, како изчезнување и/или појава на фрагменти кај растенијата од области со различна експозиција на метали. Металите, исто така индуцираат и оксидативен стрес кај испитуваното растение, *Matricaria recutita* L., што е евидентно од намалувањето на вредностите за вкупните антиоксиданси изразени како $\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ L}^{-1}$ кај примероците од Велес: *M. recutita* лист - 2080; *M. recutita* цвет - 2822, во однос на примероците од Плачковица: *M. recutita* лист - 3960 и *M. recutita* цвет - 2908. Растенијата развиваат различни механизми за справување со акумулацијата на метали и продукцијата на ROS во ткивата. Кога капацитетот на антиоксидативниот систем ќе се намали до вредности пониски од количеството генерирани ROS, се појавува оштетување на ткивата и соодветни DNA промени [Sgherri et al., 2003; Kováčik and Bačkor, 2008].

Добиените резултати покажуваат дека тешките метали можат да индуцираат антиоксидативен стрес и DNA оштетување. Антиоксидативниот систем на *Matricaria recutita* L. може да биде активиран од тешки метали присутни во животната средина. Рамнотежата на различните нивоа од растителниот метаболизам е есенцијална за

АНТИОКСИДАТИВЕН СТАТУС И DNA ОШТЕТУВАЊЕ ИНДУЦИРАНО ОД ТЕШКИ МЕТАЛИ КАЈ *MATRICARIA RECUTITA* L. (*ASTERACEAE*)

Даринка Ѓоргиева¹, Татјана Кадифкова-Пановска², Татјана Рушковска¹

¹Факултет за медицински науки, Универзитет "Гоце Делчев", Штип, Р. Македонија,

²Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје, Р. Македонија

Растителниот свет претставува богат извор на секундарни метаболити и активни компоненти, со потенцијална антиоксидативна активност [Kähkönen 1999]. Често тешките метали вршат влијание врз живите организми, што доведува до продукција на реактивни кисло-

елиминација на токсичните ефекти на металите и одржувањето на структурниот и метаболичкиот интегритет. Карактеристичното зголемување на продукцијата на ROS, е претпоставен механизам за оксидативниот стрес, но потребни се дополнителни истражувања на молекуларно и субклеточно ниво за подлабоко проникнување во разбирањето на точниот механизам на токсичност на металите.

ЛИТЕРАТУРА

- Benzie IFF, Strain JJ (1996). The ferric-reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76
- Dixit V, Pandey V, Shyam R (2001). Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *J Exp Bot* 52:1101-1109.
- Enan MR (2006). Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. *Biotechnol Appl Biochem* 43:147-154
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM (1997). Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol Plant* 100:241-254
- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha J, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47:3954-3962
- Kekec G, Sakcali MS, Uzunor I (2010). Assessment of genotoxic effects of boron on wheat (*Triticum aestivum* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using RAPD analysis. *Bull Environ Contam Toxicol* 84(6):759-764
- Kováčik J, Bačkor M (2008). Oxidative status of *Matricaria chamomilla* plants related to cadmium and copper uptake. *Ecotoxicology* 17:471-479
- Radić S, Cvjetko P, Glavaš K, Roje V, Pevalak-Kozlina B, Pavlica M (2009). Oxidative stress and DNA damage in broad bean (*Vicia faba* L.) seedlings induced by thallium. *Environ Toxicol Chem* 28(1):189-196
- Sawa D (1998). Use of DNA fingerprinting to detect genotoxic effects. *Ecotoxicol Environ Safety* 41:103-106.
- Sgherri C, Cosi E, Navari-Izzo F (2003). Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiol Plant* 118:21-28
- Van Assche F, Clijsters H (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ* 13:195-206.

duced by toxic chemicals containing different metals (Cu, Mn, Pb, Ni, Cd and Zn) using RAPD technique in the plant model system treated with two selected concentrations and to investigate if plant bioassays can effectively detect the genotoxic effects of toxic metals and might be useful for biomonitoring.

The common bean, *Phaseolus vulgaris* L. (*Fabaceae*) was used as plant material. This plant is exposed to heavy metals in his natural environment as a result of various human activities. Plant seedlings were grown in sterile vitro containers containing liquid medium (untreated control treatment) [Murashige and Skoog 1962] or supplemented with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, NiSO_4 , $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ and $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ as treatment solutions. The seedlings were treated with the solution of toxic chemicals at the concentrations of 150 mg L⁻¹ and 350 mg L⁻¹ for 7 days in a growth chamber with a 16 h photoperiod, with light intensity of $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. DNA extractions were performed using REDEExtract-N-Amp Seed PCR Kit (Sigma-Aldrich). Amplifications were performed in a DNA thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf) using 5 steps PCR-protocol [Enan MR, 2006].

The marked changes observed in RAPD profiles (disappearance and/or appearance of bands in comparison with untreated control samples) were evaluated. Numerical analysis based on banding pattern obtained from treated samples was compared with the untreated sample (control) via hierarchical cluster analysis using NTSYSps (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) program with SAHN module [Rohlf 1994]. RAPD profiles generated by treated samples were different from those obtained using control DNA. The samples treated with 350 mg L⁻¹ of toxic metals yielded a large number of new fragments (total 11) compared with total number of new fragments (total 5) at 150 mg L⁻¹. Similarly, the total number of disappeared fragments was 7 at 350 mg L⁻¹, whereas at 150 mg L⁻¹, the number of disappeared bands was 5. The highest number of missing bands was observed in samples treated with zinc (total 4 bands) and nickel (total 4 bands) at both concentrations. The highest number of appearance of new fragments (total 3) is recorded in DNA samples treated with copper at concentration 350 mg L⁻¹. In our study, the number of lost bands was found higher than that of extra bands. The disappearance of normal bands may be related to the DNA damage (e.g. single-strand breaks, double-strand breaks, modified or oxidized bases, bulky adduct), point mutations and/or complex chromosomal rearrangements induced by genotoxic chemicals [Atienzar and Jha 2006].

The presence in the DNA "fingerprint" of any variable RAPD profiles can be evidence for genotoxicity and used for hazard identification of environmental pollutants like xenobiotics. Plant bioassays can effectively detect the genotoxic effects and might be useful tool for biomonitoring.

REFERENCES

- Atienzar FA, Venier P, Jha AN, Depledge MH (2002) Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. *Mutat Res* 521: 151-163
- Atienzar FA, Jha AN (2006) The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutat Res* 613: 76-102
- Čenkci S, Yildiz M, Cimerci IH, Konuk M, Bozdağ A (2009) Toxic chemicals-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Chemosphere* 76: 900-906
- Enan MR (2006) Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. *Biotechnol Appl Biochem* 43: 147-154
- Murashige T, Skoog FA (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-479
- Rohlf FJ (1994) Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.70. Exeter Software, Setauker, NY
- Theodorakis CW, Bickham JW (2004) Molecular characterisation of contaminant-indicative RAPD markers. *Ecotoxicology* 13: 303-309

Darinka Gjorgieva¹, Tatjana Kadifkova-Panovska², Saša Mitrev³, Emilija Kostadinovska³, Biljana Kovacevik³

¹Faculty of Medical Sciences, Goce Delčev University, Štip, R. Macedonia,

²Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril and Methodius University, Skopje, R. Macedonia,

³Faculty of Agriculture, Goce Delčev University, Štip, R. Macedonia

With fast economic development and industrialization, a vast range of genotoxic chemicals were produced, and distributed in the environment. These chemicals adversely affect living organisms, and often lead to serious diseases to human being. Due to the highly conserved structure of the genetic material, it is possible to use a broad variety of species including bacteria, yeasts, animals and plants in genotoxicity tests. Higher plants provide a useful genetic system for screening and monitoring environmental pollutants. Recently, advances in molecular biology have led to the development of a number of selective and sensitive assays for DNA analysis in eco-genotoxicology [Theodorakis and Bickham 2004]. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) of these techniques can be used to detect genotoxicity and differences in RAPD profiles and can clearly be shown when comparing DNA fingerprints from untreated and treated individuals to genotoxic agents [Atienzar et al. 2002; Enan 2006; Čenkci et al. 2009].

The aim of the present study was to evaluate the DNA changes in-

ИСПИТУВАЊЕ НА ГЕНОТОКСИЧНОСТ НА КСЕНОБИОТИЦИ СО RAPD-PCR

Даринка Ѓоргиева¹, Татјана Кадифкова-Пановска²,
Саша Митрев³, Емилија Костадиновска³,
Билјана Ковачевиќ³

¹Факултет за медицински науки, Универзитет "Гоце Делчев", Штип, Р.
Македонија,

²Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје,
Р. Македонија,

³Земјоделски факултет, Универзитет "Гоце Делчев", Штип, Р.
Македонија

Со брзиот економски развој и индустријализација, широк спектар на генотоксични хемикалии се продуцираат и дистрибуираат во животната средина. Овие хемикалии влијаат врз живите организми и често предизвикуваат сериозни заболувања. Поради строго дефинираната структура на генетскиот материјал, во генотоксиколошките тестирања можно е користење на различни видови како модел системи, меѓу кои бактерии, квасници, животни и растенија. Вишите растенија се корисен генетски систем за скрининг и мониторинг на загадувачите на животната средина. Напредокот во молекуларната биологија доведе до развој на бројни селективни и сензитивни методи за DNA анализи во генотоксикологијата [Theodorakis and Bickham 2004]. Методот со случајно амплифицирана полиморфна DNA (RAPD) може да биде користен за детектирање на генотоксичност, а разликите во RAPD профилите јасно можат да бидат покажани со компарирање на DNA "отпечатоци" од експонирани и неекспонирани индивидуи на генотоксични агенси [Atienzar et al. 2002; Enan 2006; Cenkcı et al. 2009].

Цел на студијата е евалуација на DNA промени индуцирани од токсични хемикалии кои содржат различни метали (Cu, Mn, Pb, Ni, Cd and Zn) со користење на RAPD методот кај растителен модел систем третиран со две одбрани концентрации на метали, и испитување на можноста за детектирање на генотоксични ефекти со растителен модел системи и нивна употреба во биомониторингот. Како растителен материјал е користено семе од растението грав, *Phaseolus vulgaris L. (Fabaceae)*. Ова растение во својата животна средина може да биде експонирано на тешки метали како резултат на различни активности на човекот. Семињата се поставуваат во стерилни стаклени садови и третираат со течен медиум за раст (нетретиран контролен примерок) [Murashige and Skoog 1962] или со додаток на $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, NiSO_4 , $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ и $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ како раствори на токсични метали. Примероците се третираат со растворите на токсични метали во концентрации од 150 mg L^{-1} и 350 mg L^{-1} во период од 7 дена во комора за раст со 16 часовен фотопериод и интензитет на светлина од $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. DNA екстракцијата е направена со користење на REDEExtract-N-Amp Seed PCR Kit (Sigma-Aldrich). Амплификацијата се изведува во DNA thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf) со користење на протокол во 5 чекори [Enan MR, 2006].

Евалуирани се промените во RAPD профилите (изчезнување и/или појава на фрагменти во компарација со нетретираниот контролен примерок) добиени од контролниот и примероците третиран со метали. Направена е нумеричка анализа на податоците со користење на кластер анализа и конструирање дендрограм со NTSYSps (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) програма со SAHN модул [Rohlf 1994]. RAPD профилите генерирани од третира-

ните примероци во сите случаи беа различни од профилот добиен со контролната DNA. Кај примероците третиран со 350 mg L^{-1} токсични метали, детектирани се повеќе новопојавени фрагменти (вкупно 11) во споредба со новите фрагменти (вкупно 5) при концентрација 150 mg L^{-1} . Слично како во претходниот случај, вкупниот број на изчезнати фрагменти беше 7 при концентрација 350 mg L^{-1} , додека при концентрација 150 mg L^{-1} бројот на изчезнати фрагменти е 5. Најголем број на изчезнати фрагменти е набљудуван кај примероците третиран со цинк (вкупно 4 фрагменти) и со двете концентрации. Најголем број на ново појавени фрагменти (вкупно 3 фрагменти) е набљудуван кај примероците третиран со бакар при концентрација 350 mg L^{-1} . Во оваа студија, детектиран е поголем број на изчезнати отколку новопојавени фрагменти. Изчезнувањето на нормално присутни фрагменти може да биде поврзано со DNA оштетувања (на пример, верижни прекини, ново двојноверижно поврзување, модификација или оксидација на бази, формирање на големи волуминозни групи), точкести мутации и/или комплексни хромозомски реаранжмани индуцирани од токсични хемикалии [Atienzar and Jha 2006].

Присуството на варијабилни RAPD фрагменти во DNA "отпечатокот" може да биде доказ за генотоксичност индуцирана од ксенобиотици и искористено за идентификација на загадувачи на животната средина, меѓу кои и токсичните метали. Со растителните модел системи може ефективно да се детектираат генотоксични ефекти и истите да се користат како успешни алатки за биомониторирање.

ЛИТЕРАТУРА

- Atienzar FA, Venier P, Jha AN, Depledge MH (2002) Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. *Mutat Res* 521: 151-163
- Atienzar FA, Jha AN (2006) The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutat Res* 613: 76-102
- Cenkcı S, Yildiz M, Cı̇erci IH, Konuk M, Bozdağ A (2009) Toxic chemicals-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris L.*) seedlings. *Chemosphere* 76: 900-906
- Enan MR (2006) Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. *Biotechnol Appl Biochem* 43: 147-154
- Murashige T, Skoog FA (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-479
- Rohlf FJ (1994) Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.70. Exeter Software, Setauker, NY
- Theodorakis CW, Bickham JW (2004) Molecular characterisation of contaminant-indicative RAPD markers. *Ecotoxicology* 13: 303-309

DRUGS MAY CONTRIBUTE ORAL-FACIAL CLEFTS IN NEWBORN BABY

Velickova, N., Gacova, M., Kamcev,
N., Angelovska, B., Dimova, C.

Faculty of medical science, University "Goce Delcev" - Stip

INTRUDUCTION

A cleft is a gap in a body structure that results from incomplete closing of a specific structure during development. Clefts that occur in the lip and palate (roof of the mouth) are called oral-facial clefts. These birth defects occur very early in fetal development. The causes of these birth defects are not well understood. Cleft lips and palates are caused by a combination of genetic and environmental factors. Studies suggest that a number of genes, as well as environmental factors can cause oral-facial clefts.

The aim of this study was to evaluate the risks factors, incidence, causes and symptoms of oral facial clefts at the children hospitalized in the children's ward in Stip.

MATERIAL AND METHODS

After birth, cleft lip and palate were diagnosed by physical exam. The risks factors and special exposure of their mothers during pregnancy were assessed. Also, the incidence, causes and symptoms at the children with oral facial clefts were evaluated. Their parents did not have oral-facial clefts.

RESULTS

The results indicated that during past 10 year children with oral facial clefts were born in series in the same or closer month in the year (in the summer and the autumn). Also, was found that every year increased the number of children with oral-facial clefts and they were not associated with other syndrome. Children with oral-facial clefts have special problems and complication like feeding difficulties, ear infections and hearing loss.

CONCLUSION

The obtained results suggest that environmental factors, such as drugs (including several different anti-seizure drugs) and maternal smoking, are risk factors for appearance of oral-facial clefts. We concluded that seasonal causes (such as pesticide exposure); maternal diet and vitamin intake; retinoids, which are members of the vitamin A family; anticonvulsant drugs; alcohol; cigarette use; nitrate compounds; organic solvents; parental exposure to lead; as teratogens increase the possibility of clefting. An increased risk for isolated oral-facial clefts was found in cases born to mothers treated with amoxicillin, phenytoin, oxprenolol, and thiethylperazine during the second and third month of pregnancy, which is the critical period for during fetal development.

REFERENCES

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Improved National Prevalence Estimates for 18 Selected Major Birth Defects - United States, 1999-2001. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, volume 54, January 6, 2006, pages 1301-1305.
- Zuccherro, T.M., et al. Interferon Regulatory Factor 6 (IRF6) Gene Variants and the Risk of Isolated Cleft Lip or Palate. *New England Journal of Medicine*, volume 351, number 8, August 19, 2004, pages 769-780.
- Chakravarti, A. Finding Needles in Haystacks—IRF6 Gene Variants in Isolated Cleft Lip or Cleft Palate: Editorial. *New England Journal of Medicine*, volume 351, number 8, August 19, 2004, pages 822-824.
- Botto, L.D., et al. Vitamin Supplements and the Risk for Congenital Anomalies Other Than Neural Tube Defects. *American Journal of Med. Genet. C Semin. Med. Genet.*, volume 125, number 1, February 2004, pages 12-21.
- On-Line Mendelian Inheritance in Man. Orofacial cleft 1 #119530, updated 2/2/06, and Cleft Palate, Isolated #119540, updated 4/26/04, ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=retrieve&db=OMIM
- American Society of Plastic Surgeons. Cleft lip and Palate. Arlington Heights, IL, accessed 4/24/06.
- Cleft Plate Foundation. Cleft Palate Foundation publications. Chapel Hill, NC, accessed 4/24/06.
- Wilcox, A.J., et al. Folic Acid Supplements and the Risk of Facial Clefts: A National Population-Based Case-Control Study. *British Medical Journal*, January 26, 2007.
- Lammer, E.J., and Shaw, G.M. Maternal Smoking, Genetic Variation of Glutathione S Transferases, and Risk for Orofacial Clefts. *Epidemiology*, volume 16, number 5, September 2005, pages 698-701.
- Lammer, E.J., et al. Maternal Smoking and the Risk of Orofacial Clefts: Susceptibility with NAT1 and NAT2 Polymorphisms. *Epidemiology*, volume 15, number 2, March 2004, pages 150-156.
- Chevrier, C., et al. Interaction Between ADH1C Polymorphism and Maternal Alcohol Intake in the Risk of Nonsyndromic Oral Clefts: An Evaluation of the Contribution of Child and Maternal Genotypes. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Terat.*, volume 73, number 2, February 2005, pages 114-222.

ЛЕКОВИ КОИ МОЖАТ ДА ПРЕДИЗВИКААТ РАСЦЕПИ НА УСТАТА И НЕПЦЕТО КАЈ НОВОРОДЕНЧИЊА

Величкова, Н., Гацова, М., Камчев, Н., Ангеловска, Б., Димова, С.

Faculty of medical science, University "Goce Delcev" – Stip

ВОВЕДЕН ДЕЛ

Расцепите на усната и непцето се пукнатини кои се јавуваат во тек на ембрионалниот развој и истите се резултат на неадекватно спојување на ткивата во усната празнина. Постојат два вида на расцепи: расцепи на усната и расцепи на непцето. Причините за појава на расцепи сеуште не се доволно разјаснети. Истражувањата укажуваат дека поголем број на надворешни фактори можат да предизвикаат расцепи на усната и непцето.

ЦЕЛ НА ТРУДОТ

Цел на овој труд е да се укаже на можните ризични фактори кои можат да доведат до појава на расцепи во усната и непцето, инциденцата, причините и симптомите кај деца со расцепи на усната и непцето, хоспитализирани на Детското одделение во Штип.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Расцепите на усна и непце се дијагностицираат клинички од страна на педијатар. Земени се во предвид сите ризични фактори кои влијаеле кај мајките во текот на бременоста. Во истражувањата се елаборирани причините за појава на расцепи, инциденцата и симптомите на расцепи. Во испитувањата се опфатени новороденчиња чии родители немаат фамилијарна предиспозиција за расцепи на усната и непцето.

РЕЗУЛТАТИ

Резултатите покажаа дека во последните 10 години на Детското одделение во Штип се регистрирани новороденчиња со расцепи во одредени периоди од годината (обично пролет и есен). Овие расцепи не се поврзани со ниту еден друг синдром. Новороденчињата имаат дополнителни компликации со исхраната и проблеми со слухот како резултат на инфекции.

ЗАКЛУЧОК

Резултатите укажуваат дека надворешните фактори како што се пушењето и изложеноста и користењето на пестициди (од страна на мајките во текот на бременоста), недостатокот на витамини, (пред се ретиноиди), внесувањето на алкохол претставуваат ризични тератогени фактори кои можат да придонесат за појава на расцепи на усната и непцето. Високо ризичен фактор за појава на расцепи претставува и внесот на одредени лекови како што се amoxicillin, phenytoin, oxprenolol, и thiethylperazine, особено во вториот и третиот месец во текот на бременоста, кој е критичен период за формирање на сите ткива во ембрионот.

REFERENCES

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Improved National Prevalence Estimates for 18 Selected Major Birth Defects - United States, 1999-2001. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, volume 54, January 6, 2006, pages 1301-1305.
- Zuccherro, T.M., et al. Interferon Regulatory Factor 6 (IRF6) Gene Variants and the Risk of Isolated Cleft Lip or Palate. *New England Journal of Medicine*, volume 351, number 8, August 19, 2004, pages 769-780.
- Chakravarti, A. Finding Needles in Haystacks—IRF6 Gene Variants in Isolated Cleft Lip or Cleft Palate: Editorial. *New England Journal of Medicine*, volume 351, number 8, August 19, 2004, pages 822-824.

Botto, L.D., et al. Vitamin Supplements and the Risk for Congenital Anomalies Other Than Neural Tube Defects. *American Journal of Med. Genet. C Semin. Med. Genet.*, volume 125, number 1, February 2004, pages 12-21.

On-Line Mendelian Inheritance in Man. Orofacial cleft 1 #119530, updated 2/2/06, and Cleft Palate, Isolated #119540, updated 4/26/04, ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=retrieve&db=OMIM

American Society of Plastic Surgeons. Cleft lip and Palate. Arlington Heights, IL, accessed 4/24/06.

Cleft Plate Foundation. Cleft Palate Foundation publications. Chapel Hill, NC, accessed 4/24/06.

Wilcox, A.J., et al. Folic Acid Supplements and the Risk of Facial Clefts: A National Population-Based Case-Control Study. *British Medical Journal*, January 26, 2007.

Lammer, E.J., and Shaw, G.M. Maternal Smoking, Genetic Variation of Glutathione S Transferases, and Risk for Orofacial Clefts. *Epidemiology*, volume 16, number 5, September 2005, pages 698-701.

Lammer, E.J., et al. Maternal Smoking and the Risk of Orofacial Clefts: Susceptibility with NAT1 and NAT2 Polymorphisms. *Epidemiology*, volume 15, number 2, March 2004, pages 150-156.

Chevrier, C., et al. Interaction Between ADH1C Polymorphism and Maternal Alcohol Intake in the Risk of Nonsyndromic Oral Clefts: An Evaluation of the Contribution of Child and Maternal Genotypes. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Terat.*, volume 73, number 2, February 2005, pages 114-222.

OXIDATIVE DAMAGE OF PROTEINS IN PLASMA OF RATS EXPOSED TO ACUTE ORAL OR INTRAPERITONEAL TREATMENT WITH CADMIUM

Aleksandra Buha¹, Jelena Kotur-Stevuljević², Zorica Bulat¹, Danijela Djukic-Cosic¹, Jasmina Ivanišević², Vesna Matovic¹

¹Department of Toxicology "Akademik Danilo Soldatović", Faculty of Pharmacy, University of Belgrade

²Department of Medical Biochemistry, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade

Various studies have shown that cadmium (Cd) toxicity is associated with the induction of oxidative stress. Although it is generally accepted that oxidative stress plays important role in acute Cd poisoning, the Cd pro-oxidant activity and interference with the cell antioxidant system are still not completely understood.

The aim of this study was to investigate the influence of acute oral and intraperitoneal Cd treatment on parameters indicative of oxidative stress and protein damage in plasma of rats.

The study was performed on male albino Wistar rats (n=24) that were randomly divided into three groups, each containing 8 animals: 1. control non-treated group; 2. cadmium-treated group that received Cd as an aqueous solution of CdCl₂ in a dose of 30 mg Cd/kg bw by oral gavage and 3. cadmium-treated group that received Cd as an aqueous solution of CdCl₂ in a dose of 1.5 mg Cd/kg bw. by intraperitoneal (i.p.) injection. Twenty-four hours after cadmium administration the rats were sacrificed after ether anesthesia and blood samples were collected from heart. Plasma was prepared from collected blood samples and used for determination of oxidative stress parameters.

Superoxide-dismutase (SOD) activity, levels of superoxide anion (O₂⁻) and advanced oxidation protein products (AOPP) were measured as markers of oxidative stress in plasma. Method for determination of plasma SOD activity is based on the measurement of the activity that inhibits the auto-oxidation of adrenalin by 50%. The rate of nitroblue tetrazolium reduction was used to measure the level of O₂⁻. AOPP

determination was based on the spectroscopic analysis of modified proteins at 340 nm.

Data comparisons were carried out using Kruskal-Wallis nonparametric test followed by post-hoc Conover test for pairwise comparison. SOD activity was markedly decreased after cadmium intraperitoneal administration in contrast to the control group and orally treated group (p<0.01). Intraperitoneal Cd intoxication also led to significant increase of O₂⁻ and AOPP levels in plasma (p<0.01) when compared to other two groups. Spearman's correlation was also performed in order to determine the relationship between these parameters in the group that was intraperitoneally treated with Cd. There was a strong negative correlation between SOD activity and O₂⁻ concentration (r_s=-0.77) and this can be clarified by the fact that SOD is an enzyme that catalyze dismutation of this primary free radical. Strong positive correlation between O₂⁻ and AOPP concentration (r_s=0.78) was also found and this is in accordance with radical mediated protein oxidation. By contrast, Cd oral treatment failed to alter oxidative status in plasma when compared to control group. Accordingly, Cd oral administration also had no statistically significant influence on the level of protein oxidation in plasma.

These findings contribute to the investigations of the effect of Cd on the induction of oxidative stress as one of the important mechanisms of its toxicity. However, the obtained results show that the induction of oxidative stress and oxidative damage of proteins in plasma depends on the administered dose of Cd and its route of exposure.

REFERENCES

Liu, J., Qu, W., Kadiiska, M.B.. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;238:209-14.

Matović V, Buha A, Bulat Z, Đukić-Čosić D. Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. *Arh Hig Rada Toksikol* 2011;62:65-76.

Matović V, Plameac-Bulat Z, Đukić D. Influence of increased cadmium intake on antioxidant defence system. *Jugoslav Med Biochem* 2004; 23:117-126.

Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005;12:1161-208.

CARBON MONOXIDE LEVELS IN BLOOD OF SMOKERS AND NON-SMOKERS DETERMINED BY GAS CHROMATOGRAPHY

Aleksandra Buha¹, Zorica Bulat¹, Veljko Petrović², Ivana Jakovljević², Teodora Đikić², Aleksandra Grković², Vesna Matović¹

¹Department of Toxicology "Akademik Danilo Soldatović", Faculty of Pharmacy, University of Belgrade,

²Student's Center for Scientific Research, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade

Carbon monoxide (CO) is one of the most important environmental pollutants that humans are exposed to from the earliest days. It can cause accidental, professional and suicidal acute poisonings. However, recent studies showed that chronic exposure to CO can also cause serious health problems. Since tobacco smoke contains high amounts of CO, smoking can be regarded as a relevant source of prolonged exposure of general population to this toxic agent.

The aim of this study was to determine CO levels in the blood of smok-

ers and non-smokers using gas chromatography. A further aim of this study was to evaluate the impact of smoking habits and the time interval between the last smoke cigarette and blood sampling on CO blood levels.

Blood samples were collected from 44 Belgrade residents of different age and gender divided into two groups: smokers (23 individuals of different smoking experience) and non-smokers (21 subjects). Carboxy-hemoglobin (HbCO) is an adduction product of hemoglobin and CO and only a small amount of CO is present in blood in a free state. Hence, releasing of CO from HbCO was needed and this was performed by treating blood with 0.5 ml mixture of conc. sulfuric acid and saponins. After 24 hours concentration of released gas was measured using the gas chromatography system Agilent Technologies 6890N/Network with thermal conductivity detector under the following conditions (temperature of detector and oven 200°C and 40°C, respectively; column pressure 6.4 bar; carrier gas helium at flow rate of 4.3 ml/min; retention time for CO 5 minutes). Since blood HbCO concentrations obtained in this study in general do not follow normal distribution (Kolmogorov-Smirnov test, $p < 0.05$), nonparametric tests were used in statistical calculation for comparison of smokers and non-smokers' HbCO blood levels, while parametric tests were used for comparison of different groups of smokers (Kolmogorov-Smirnov test for smokers, $p = 0.2$).

HbCO contents in the blood were in the range of 1.79% to 9.01% for smokers, and from 1.13% to 4.58% for non-smokers. Statistically significant difference was obtained using Mann-Whitney test between the concentration of HbCO in the blood of smokers and non-smokers ($p < 0.001$). Analyzing the difference between concentrations of two groups of smokers, divided according to smoking duration (longer/shorter than 10 years) with T-test of independent samples showed no statistically significant difference. Nevertheless, the difference between HbCO blood levels in smokers with regard to recent smoking (≤ 30 min since the last cigarette) versus late smoking (> 30 min since the last cigarette) was found to be significant (T-test, $p < 0.01$). Furthermore, strong negative correlation (Pearson's $r = -0.529$) was obtained between the concentration of HbCO and time interval from the last smoked cigarette and blood sampling (HbCO was higher with shorter time interval).

These results confirm the fact that smoking is a relevant source of CO exposure. Furthermore, CO levels in the smokers' blood present caution of possible occurrence of symptoms such as dizziness, headaches, mental and physical fatigue and even permanent brain damage and cardiovascular problems.

REFERENCES

- Aberg AM, Sojka Nilson B, Winso O, Abrahamsson P, Johansson G and Larsson JE. Carbon monoxide concentration in donated blood: relation to cigarette smoking and other sources. *Transfusion* 2009;49:347-53.
- Czogala J, Wardas W, Goniewicz ML. Determination of low carboxyhemoglobin blood levels by gas chromatography. *Analytica Chimica Acta* 2006;556:295-300
- Mannaioni PF, Vannacci A, Masini E. Carbon monoxide: the bad and the good side of the coin, from neuronal death to anti-inflammatory activity. *Inflamm Res* 2006;55:261-73.
- Sundin AM, Larsson JE. Rapid and sensitive method for the analysis of carbon monoxide in blood using gas chromatography with flame ionization detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;766:115-21.

TRACE ELEMENTS LEVELS IN PATIENTS ON TREATMENT WITH ATYPICAL ANTIPSYCHOTICS

Bojana Vidović¹, Brižita Đorđević¹, Zorica Bulat²

¹Department of Bromatology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

²Department of Toxicology Academic D. Soldatović, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

INTRODUCTION AND AIM

Results of numerous studies indicate that essential trace elements play an important role in many brain disorders, including schizophrenia. The findings of previous research on the status of trace elements in patients with schizophrenia have been controversial. There is very limited information about levels of trace elements in schizophrenic patients on atypical antipsychotic treatment. The aim of this study was to investigate blood serum concentrations of iron (Fe), copper (Cu) and zinc (Zn) levels in schizophrenic patients on treatment with atypical antipsychotics and compared them with sex- and age- matched healthy control.

PATIENTS AND METHODS

We evaluated serum Fe, Zn and Cu concentrations in 18 patients with schizophrenia (diagnosis were made according to DSM-IV, mean age 33.6 ± 9.1) and in 18 healthy controls (mean age 29.4 ± 6.7). All schizophrenic patients were on treatment with various atypical antipsychotic drugs. Exclusion criteria for all subjects included other psychiatric disorder, pregnancy and medical disorder or drugs known to affect trace element metabolism. Serum Fe, Zn and Cu concentrations were determined by flame atomic absorption spectrophotometry (AAS, apparatus GBC 932AA). Comparisons between patients with schizophrenia and the control group were made using Student's t-test. The Spearman rank correlation test was used to evaluate the strength of association between variables. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant. All data were analyzed using SPSS software, version 11.5.

RESULTS

Serum Fe concentrations were significantly lower (0.88 ± 0.54 mg/L vs 1.46 ± 0.76 ; $p < 0.05$) and Zn and Cu concentrations were significantly higher (1.08 ± 0.27 mg/L vs 0.88 ± 0.23 $p < 0.05$ and 0.89 ± 0.15 vs 0.76 ± 0.16 ; $p < 0.05$, respectively) in schizophrenic patients than in healthy controls. There was no association between BMI, age, duration of illness and these element changes.

CONCLUSION

The results of our study demonstrated that serum Fe, Cu and Zn concentrations are different between patients with schizophrenia and healthy subjects, and may play a role in the etiopathogenesis of schizophrenia. Altered levels of trace elements in schizophrenic patients may be a consequence of antipsychotic treatment.

REFERENCES

- [1] Nakamura M (2005) Trace elements and neuropsychiatric disorders. *Biomed Res Trace Elements* 16(1):12-18
- [2] Yanik M, Kocyigit A, Tutkun H et al (2004) Plasma manganese, selenium, zinc, copper, and iron concentrations in patients with schizophrenia. *Biol Trace Elem Res* 98(2):109-11
- [3] Nechifor M, Vaideanu C, Palamaru I et al (2004) The influence of some antipsychotics on erythrocyte magnesium and plasma magnesium, calcium, copper and zinc in patients with paranoid schizophrenia. *J Am Coll Nutr* 23(5):549S-551S

SERUM IMMUNE RESPONSE FOR IgA AND IgG ANTIBODIES OF HELICOBACTER PYLORI FROM PATIENTS WITH GASTRIC DIFFICULTIES

Biserka Simonovska¹, Elizabeta Popovska², Nikola Simonovski³, Slavko Kostovski⁴

¹Dijagnostika FARMAHEM, 4ti Juli 2/3, 1000 Skopje, Macedonia

²Alkaloid AD, Bld. A. Makedonski 12, 1000 Skopje, Macedonia

³Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

⁴AstraMedical, Mile Popjordanov 21, 1000 Skopje, Macedonia

INTRODUCTION

Helicobacter pylori is a spiral Gram-negative bacterium (2-6 µm in size, flagellated), which colonizes the human gastric mucosa. Infection rate in Europe is about 30-40%, worldwide about 50%. The contamination begins in the childhood and can be found in 100% of adult persons who live in areas with low hygienic conditions. Not every infection gives the common symptoms of this disease. *H. pylori* infection is transmitted by oral path and it is of human nature. However, only about 10% of infected individuals develop ulcer, and only 1% develops gastric cancer.

OBJECTIVES

In this article data is processed from patients who visited our diagnostic laboratory. These patients had symptoms similar to *H. pylori* infection. Quantitative analysis were made for antibodies IgA and IgG and it is determined how many patients are showing negative reaction on this infection, how many of them are on the borderline (gray zone) and how many of the patients are positive on this infection. The percentage of diseased patients from *H. pylori* is determined and the obtained results are assorted by sex and age of the patients.

APPLIED METHODS

The principle of this test is ELISA method (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). It is a quantitative immunoenzymatic determination of IgA-class and IgG-class antibodies of *H. pylori*. Microtiter strip wells are precoated with *H. pylori* antigens to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labeled anti-human IgG conjugate is added. This conjugate binds to the captured *Helicobacter* specific antibodies.

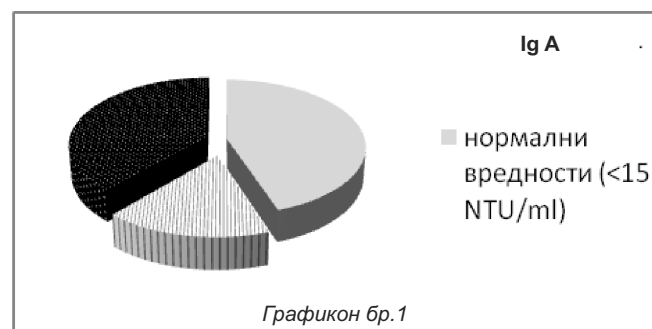
The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is proportional to the amount of *Helicobacter* specific antibodies in the specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces yellow endpoint color. Absorbance at 450nm is read using an ELISA microwell plate reader.

RESULTS

Obtained results are made analysis of antibodies to *H. pylori* - IgA, in 275 patients with mean 29,48 NTU/ml.

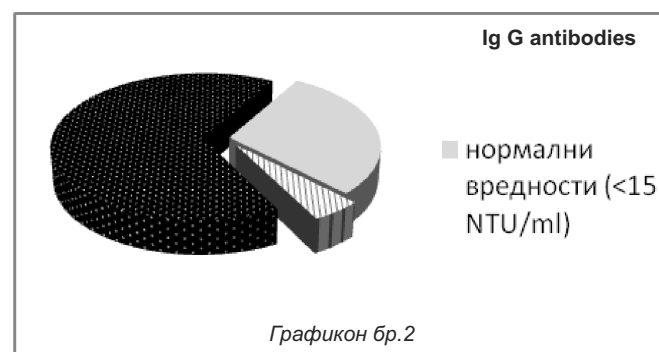
Of the total number of patients, 123 patients are with normal values (<15 NTU/ml), with mean 10,29 NTU/ml, 46 patients are in the "gray zone", ie of limit values (15-20 NTU/ml), with an average value of 17,82 NTU/ml, and a 106 patients are with elevated values (> 20 NTU/ml), with mean 56,82 NTU/ml.

Of these, 126 patients were male and 149 female patients, with the average value for male patients 30,64 NTU/ml, while in female patients - 28,44 NTU/ml.



Analyses are made of antibodies to *H. pylori* - IgG, in 353 patients, with mean 67,3 NTU/ml. Of the total number of patients, 103 patients are with normal values (<15 NTU/ml), with mean 8,00 NTU/ml, 17 patients are in the "gray zone", ie of limit values (15-20 NTU/ml), with an average value of 16,9 NTU/ml, a 233 patients are with elevated values (> 20 NTU/ml), with mean 97,19 NTU/ml.

Of these, 155 patients were male and 198 female patients, with the average value for male patients 70,62 NTU/ml, while in female patients - 64,23 NTU/ml.



CONCLUSION

From the results it can be concluded that the mean value of IgG antibodies is greater than the mean value of IgA antibodies to *H. pylori*, ie by determination of IgG antibodies, they have a higher titer. Also, the percentage of patients with elevated levels of IgG antibodies was higher compared to that of IgA antibodies.

Normal values of IgA antibodies have 44.73% of patients, limit values - 16.73% and 38.54% of the patient's values are increased.

Normal values for IgG antibodies have 29.18% of patients, limit values - 4.82%, while 66% of the patient's values are increased.

REFERENCES

1. Marshall, B.J, Royce, H, Goodwin, C.S, Taylor, N.S, Edmond, P; Original Isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa (1982);
2. Warren J.R.; Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis (1983);
3. Dubois A.; Spiral bacteria in the human stomach: The gastric *Helicobacters*.(1995);
4. Kosunen TU; et al. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titers after eradication of *Helicobacter pylori*. (1992);
5. Van Enk RA.; Serologic diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. (1996);

СЕРУМСКИ ИМУНО-ОДГОВОР НА АНТИТЕЛА НА HELICOBACTER PYLORI – IgA И IgG КАЈ ПАЦИЕНТИ СО ГАСТРИЧНИ ТЕГОБИ

Бисерка Симоновска¹, Елизабета Поповска²,
Никола Симоновски³, Славко Костоски⁴

¹Дијагностика ФАРМАХЕМ, 4ти Јули 2/3, 1000 Скопје, Македонија

²Алкалоид АД, Бул. А. Македонски 12, 1000 Скопје, Македонија

³Фармацевтски факултет-Скопје, Водњанска 17, 1000 Скопје,
Македонија

⁴AstraMedical, Миле Попјорданов 21, 1000 Скопје, Македонија

ВОВЕД

Helicobacter pylori е спирална грам-негативна бактерија (2-6 μm во големина, со флагела), која ја колонизира човечката гастрична мукоза. Степенот на оваа инфекција се движи околу 30-40% во Европа, а во светски рамки тој степен е околу 50% од населението.

Контаминацијата започнува во детството и може да ја има дури и кај 100% возрасни особи кои живеат во региони со ниски хигиенски услови. Не секоја инфекција се манифестира со симптоми на болеста. Механизмот на оваа инфекција е преку орална трансмисија од човек на човек. Постоеноста е услов за развој на дуоденален и желудочен улкус. 10% од инфицираните индивидуи развиваат улкус, а околу 1% развиваат гастричен канцер.

ЦЕЛИ

Во трудот се обработени пациенти кои ја посетиле нашата дијагностичка лабораторија, кај кои се појавиле симптоми слични на постоење на инфекција со H.pylori. Изработени се квантитативни анализи на антителата IgA и IgG при што е одредено колку од пациентите се негативни на оваа инфекција, колку имаат гранична вредност (сива зона), а колку покажуваат позитивна реакција на оваа инфекција. Одреден е процентот на заболени со H.pylori. Добиените резултати ги распределивме по пол и по возраст на пациентите.

МЕТОДИ НА РАБОТА

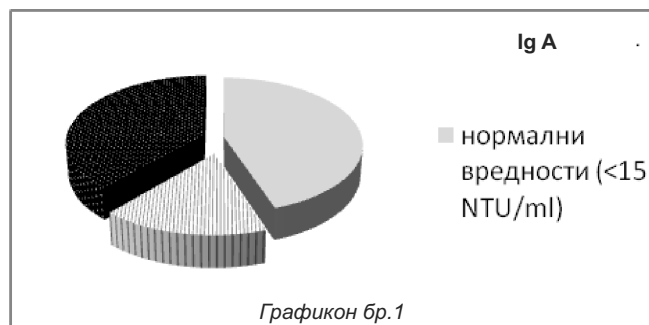
Принцип на ова испитување е ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) метода. Тоа е квантитативно имуноензимско одредување на IgA и IgG класи на антитела на H.pylori. Бунарчињата се обложени со антигени на H.pylori кои се врзуваат со совпаѓачките антитела од примероците. По перењето на бунарчињата се отстранува сè освен врзаните антитела од примерокот, се додава Horseradish peroxidase (HRP) обележан anti-human IgA конјугат. Овој конјугат се врзува со веќе врзаните Helicobacter-специфични антитела.

Формираните имунокомплекс се визуелизира со додавање тетраметилбензидин (ТМВ) супстрат кој дава син реакционен продукт. Интензитетот на реакциониот продукт е пропорционален со количината на Helicobacter-специфични антитела во примерокот. За стопирање на оваа реакција се додава сулфурна киселина. Со тоа се добива жолта боја, која е завршна точка на оваа реакција. Апсорбанцата се чита на 450nm, на ELISA читач.

РЕЗУЛТАТИ

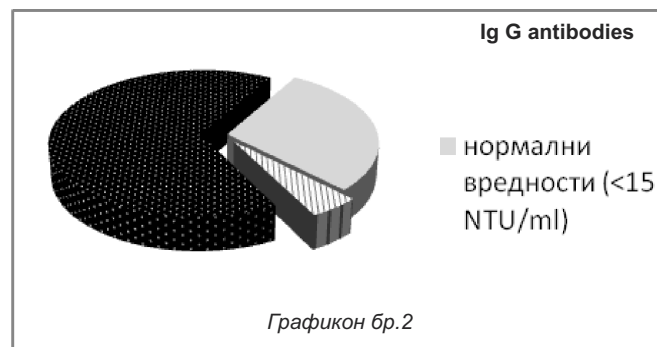
Добиени се резултати од изработени анализи на антитела на H.pylori - IgA, кај 275 пациенти, со средна вредност 29,48 NTU/ml. Од вкупниот број на пациенти, 123 пациенти се со нормални вредности (< 15 NTU/ml), со средна вредност 10,29 NTU/ml, 46 пациенти се во

„сивата зона“ т.е. на гранични вредности (15-20 NTU/ml), со средна вредност од 17,82 NTU/ml, а пак 106 пациенти, со зголемени вредности (>20 NTU/ml), со средна вредност 56,82 NTU/ml.



Од нив 126 пациенти се од машки пол и 149 пациенти од женски пол, при што средна вредност кај пациентите од машки пол изнесува 30,64 NTU/ml, а кај пациентите од женски пол – 28,44 NTU/ml. Изработени се анализи од антитела на H.pylori – IgG, кај 353 пациенти, со средна вредност 67,3 NTU/ml. Од вкупниот број на пациенти, 103 пациенти се со нормални вредности (< 15 NTU/ml), со средна вредност 8,00 NTU/ml, 17 пациенти се во „сивата зона“ т.е. на гранични вредности (15-20 NTU/ml), со средна вредност од 16,9 NTU/ml, а пак 233 пациенти, со зголемени вредности (>20 NTU/ml), со средна вредност 97,19 NTU/ml.

Од нив 155 пациенти се од машки пол и 198 пациенти од женски пол, при што средна вредност кај пациентите од машки пол изнесува 70,62 NTU/ml, а кај пациентите од женски пол – 64,23 NTU/ml.



ЗАКЛУЧОК

Од добиените резултати може да се заклучи дека средната вредност на IgG антителата е поголема од средната вредност на IgA антителата на H.pylori, т.е. при одредување на IgG антителата, истите се со повисок титар. Исто така и процентот на пациенти со зголемени вредности за IgG антитела е повисок во однос на оној кај IgA антителата. Нормални вредности за IgA антитела имаат 44,73% од пациентите, гранични вредности – 16,73%, а пак 38,54% од пациентите се со зголемени вредности.

Нормални вредности за IgG антитела имаат 29,18% од пациентите, гранични вредности – 4,82%, а пак 66% од пациентите се со зголемени вредности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Marshall, B.J, Royce, H, Goodwin, C.S, Taylor, N.S, Edmond, P; Original Isolation of Campylobacter pyloridis from human gastric mucosa (1982);
2. Warren J.R.; Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis (1983);
3. Dubois A.; Spiral bacteria in the human stomach: The gastric Helicobacters.(1995);
4. Kosunen TU; et al. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titers after eradication of Helicobacter pylori. (1992);
5. Van Enk RA.; Serologic diagnosis of Helicobacter pylori infection. (1996);

IgA AND IgG ANTIBODIES - RESPONSE IN DIAGNOSIS OF HELICOBACTER PYLORI INFECTION IN PATIENTS WITH GASTRIC SYMPTOMS

Biserka Simonovska¹, Elizabeta Popovska², Nikola Simonovski³

¹Dijagnostika FARMAHEM, 4ti Juli 2/3, 1000 Skopje, Macedonia

²Alkaloid AD, Bld. A. Makedonski 12, 1000 Skopje, Macedonia

³Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

INTRODUCTION

Helicobacter pylori is a spiral agile bacterium with flagella. Flagellums help the bacteria to find the target cell efficiently in the stomach. The bacteria adheres to the surface of epithelial cells. With the help of urease which is produced by the bacteria, it breaks down the urea, which is normally produced in the stomach. This process releases carbon dioxide and ammonia. Liberated carbon dioxide goes into bicarbonate form, which provides neutralization of acidic pH environment, which makes bacteria's better survival. The produced ammonia is toxic to the epithelial cells of the stomach and vacuolating cytotoxin A (VacA) with some phospholipases are killers for gastric cells.

OBJECTIVES

The used methods are part of non-invasive methods for determination of H.pylori infection of examined patients with gastric symptoms (abdominal pain, bloating, dyspepsia, feeling hungry 1-3 hours after meal, nausea) with simultaneous determination of IgA and IgG antibodies in serum. In this article is determined the ratio of the concentration of IgA and IgG antibodies to H.pylori. We examined how many patients have an increased value of only IgA antibodies to Helicobacter, how many patients have increased values of IgA and IgG antibodies, and how many patients have an increased concentration of IgG antibodies only.

APPLIED METHODS

The principle of this test is ELISA method (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). It is a quantitative immunoenzymatic determination of IgA-class and IgG-class antibodies of H.pylori. Microtiter strip wells are precoated with H. pylori antigens to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labeled anti-human IgG conjugate is added. This conjugate binds to the captured Helicobacter specific antibodies.

The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is proportional to the amount of Helicobacter specific antibodies in the specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces yellow endpoint color. Absorbance at 450nm is read using an ELISA microwell plate reader.

RESULTS

Obtained results are made analysis of antibodies to H.pylori - IgA/IgG, in 203 patients. The resulting concentration of IgA antibodies has mean of 28,13 NTU/ml.

Of the total number of patients, 88 patients are with normal values (<15 NTU/ml), with mean 10,15±2,99 NTU/ml, 32 patients are in the "gray zone", ie of limit values (15-20 NTU/ml), with an average value of 17,78±1,49 NTU/ml, and a 83 patients are with elevated values (> 20

NTU/ml), with mean 51,17 (range 20-246,7) NTU/ml.

Analyses are made of antibodies to H.pylori - IgG, in 203 patients, with mean 70,61 NTU/ml. Of the total number of patients, 53 patients are with normal values (<15 NTU/ml), with mean 8,31±3,49 NTU/ml, 11 patients are in the "gray zone", ie of limit values (15-20 NTU/ml), with an average value of 16,76±1,72 NTU/ml, a 139 patients are with elevated values (> 20 NTU/ml), with mean 98,63 (range 20,4-408) NTU/ml.

We made a table presentation of patients with different layout of concentrations for IgA and IgG antibodies. 7.88% of patients have increased concentrations for IgA, and normal concentrations for IgG antibodies to H.pylori. 32.02% of patients have increased concentrations for IgA and IgG antibodies to H.pylori, and 26.11% of patients have normal concentrations of IgA, and increased concentration for IgG antibodies to H.pylori.

CONCLUSION

Of all infected individuals, more than 90% of patients have increased concentrations of IgG antibodies, and approximately 70% of these individuals also have increased concentrations of IgA antibodies. Only approximately 7% of infected individuals are IgA positive and IgG negative. In our study, 69% had elevated levels of IgG and 41% increased values of IgA antibodies to H.pylori. Only 7.88% had elevated levels of IgA antibodies, and normal values for IgG antibodies to H.pylori. The percentage of increased values for IgG and IgA antibodies to H.pylori in patients who visited our lab is lower because in those patients are not diagnosed with an infection of Helicobacter pylori, but the patients complained of symptoms like gastritis. If patients found an increased amount of antibodies - IgA, IgG and/or IgA/IgG to H.pylori it is recommended to make more accurate tests such as endoscopy.

REFERENCES

1. Marshall, B.J, Royce, H, Goodwin, C.S, Taylor, N.S, Edmond, P; Original Isolation of Campylobacter pyloridis from human gastric mucosa (1982);
2. Warren J.R.; Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis (1983);
3. Dubois A.; Spiral bacteria in the human stomach: The gastric Helicobacters.(1995);
4. Kosunen TU; et al. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titers after eradication of Helicobacter pylori. (1992);
5. Van Enk RA.; Serologic diagnosis of Helicobacter pylori infection. (1996);
6. Li S, Lu AP, Zhang L, Li YD; Anti-Helicobacter pylori immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody responses and the value of clinical presentations in diagnosis of H. pylori infection in patients with precancerous lesions. (2003);

IgA И IgG АНТИТЕЛА – ОДГОВОР ВО ДИЈАГНОЗА НА HELICOBACTER PYLORI КАЈ ПАЦИЕНТИ СО ГАСТРИЧНИ СИМПТОМИ

Бисерка Симоновска¹, Елизабета Поповска², Никола Симоновски³

¹Дијагностика ФАРМАХЕМ, 4ти Јули 2/3, 1000 Скопје, Македонија

²Алкалоид АД, Бул. А. Македонски 12, 1000 Скопје, Македонија

³Фармацевтски факултет-Скопје, Водњанска 17, 1000 Скопје, Македонија

ВОВЕД

Helicobacter pylori е спирална подвижна бактерија со флагели. Флагелите и помагаат ефикасно да ја најде целната клетка во желудникот. Бактеријата адхерира кон површината на епителните

клетки. Со помош на уреазата која ја продуцира, од уреата која ја има нормално во желудникот, се ослободува јаглерод диоксид и амонијак. Ослободениот јаглерод диоксид преминува во бикарбонатна форма, која врши неутрализација на киселата рН средина, со што бактеријата си го олеснува својот опстанок. Произведениот амонијак е токсичен за епителните клетки на желудникот и заедно со вакуализираниот цитотоксин А (VacA) и некои фосфолипази ги уништуваат желудочните клетки.

ЦЕЛИ

Со оваа метода која спаѓа во неинвазивните методи за одредување на инфекција на *H.pylori* испитани се пациенти со гастрични симптоми (болки во стомакот, надуеност, диспепсија, чувство на глад 1-3 часа по оброк, гадење) преку истовремено одредување на IgA и IgG антитела во серум. Во овој труд е одреден односот на концентрацијата на IgA и IgG антитела на *H.pylori*. Испитано е колку од пациентите имаат зголемена вредност само на IgA антитела на *Helicobacter*, колку од пациентите имаат зголемени вредности и на IgA и IgG антитела, а колку од пациентите имаат зголемена концентрација само на IgG антитела.

МЕТОДИ НА РАБОТА

Принцип на ова испитување е ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) метода. Тоа е квантитативно имуноензимско одредување на IgA и IgG класи на антитела на *H.pylori*. Бунарчињата се обложени со антигени на *H.pylori* кои се врзуваат со совпаѓачките антитела од примероците. По перењето на бунарчињата се отстранува сè освен врзаните антитела од примерокот, се додава Horseradish peroxidase (HRP) обележан anti-human IgA конјугат. Овој конјугат се врзува со веќе врзаните *Helicobacter*-специфични антитела.

Формираниот имунокомплекс се визуелизира со додавање тетраметилбензидин (ТМВ) супстрат кој дава син реакционен продукт. Интензитетот на реакциониот продукт е пропорционален со количината на *Helicobacter*-специфични антитела во примерокот. За стопирање на оваа реакција се додава сулфурна киселина. Со тоа се добива жолта боја, која е завршна точка на оваа реакција. Апсорбанцата се чита на 450nm, на ELISA читач.

РЕЗУЛТАТИ

Добиени се резултати од изработени анализи на антитела на *H.pylori* – IgA/IgG, кај 203 пациенти. Добиената концентрација на IgA антитела е со средна вредност 28,13 NTU/ml. Од вкупниот број на пациенти, 88 пациенти се со нормални вредности за IgA (< 15 NTU/ml), со средна вредност 10,15±2,99 NTU/ml, 32 пациенти се во „сивата зона“ т.е. на гранични вредности (15-20 NTU/ml), со средна вредност од 17,78±1,49 NTU/ml, а пак 83 пациенти, со зголемени вредности (>20 NTU/ml), со средна вредност 51,17 (range 20-246,7) NTU/ml.

Изработени се анализи од антитела на *H.pylori* – IgG, кај 203 пациенти, со средна вредност 70,61 NTU/ml. Од вкупниот број на пациенти, 53 пациенти се со нормални вредности (< 15 NTU/ml), со средна вредност 8,31±3,49 NTU/ml, 11 пациенти се во „сивата зона“ т.е. на гранични вредности (15-20 NTU/ml), со средна вредност од 16,76±1,72 NTU/ml, а пак 139 пациенти, со зголемени вредности (>20 NTU/ml), со средна вредност 98,63 (range 20,4-408) NTU/ml.

Направен е табеларен приказ на пациенти со различен распоред на концентрации на IgA и IgG антитела. 7,88% од пациентите имаат зголемена концентрација на IgA, а нормална концентрација на IgG антитела на *H.pylori*. 32,02% од пациентите имаат зголемена концентрација на IgA и IgG антитела на *H.pylori*, а 26,11% од пациентите имаат нормална концентрација на IgA, а зголемена концентрација на IgG антитела на *H.pylori*.

ЗАКЛУЧОК

Од сите инфицирани индивидуи, повеќе од 90% од пациентите имаат зголемена концентрација на IgG антитела, а приближно 70% од овие индивидуи имаат исто така зголемени концентрации на IgA антитела. Само приближно 7% од инфицираните индивидуи се IgA позитивни, а IgG негативни. Во нашето испитување, 69% имаат зголемени вредности на IgG и 41% зголемени вредности на IgA антитела на *H.pylori*. Само 7,88% имаат зголемени вредности за IgA антитела, а нормални вредности на IgG антитела за *H.pylori*. Процентот на зголемени вредности на IgG и IgA антителата на *H.pylori* кај пациенти кои ја посетија нашата лабораторија е понизок бидејќи кај тие пациенти не е дијагностицирана инфекција на *Helicobacter pylori*, пациентите се жалеле на симптоми слични на гастрит. Доколку кај пациентите е најдена зголемена вредност на антитела - IgA, IgG и/или IgA/IgG на *H.pylori* се препорачува да се направат попрецизни испитувања како што е ендоскопијата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Marshall, B.J, Royce, H, Goodwin, C.S, Taylor, N.S, Edmond, P; Original Isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa (1982);
2. Warren J.R.; Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis (1983);
3. Dubois A.; Spiral bacteria in the human stomach: The gastric *Helicobacters*.(1995);
4. Kosunen TU; et al. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titers after eradication of *Helicobacter pylori*. (1992);
5. Van Enk RA.; Serologic diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. (1996);
6. Li S, Lu AP, Zhang L, Li YD; Anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody responses and the value of clinical presentations in diagnosis of *H. pylori* infection in patients with precancerous lesions. (2003);

CLA-CONTAINING FOOD SUPPLEMENTS ON BULGARIAN MARKET

Assena Stoimenova, Lili Peykova, Maria Kostova, Stefka Pankova, Kosta Todorov, Lidia Stoycheva, Danka Obreshkova

Faculty of Pharmacy, Medical University, Sofia

INTRODUCTION

Conjugated linoleic acid (CLA) is a mixture of positional and geometric isomers of linoleic acid in which the double bonds are conjugated.[1] CLA is a common dietary component, with the main sources being beef, lamb, and dairy products. [2] Several physiological effects have been identified, including effects on body composition, serum glucose and insulin, carcinogenesis, cardiovascular variables, bone formation, and immune function. [3] The CLA effect on fat loss has been seen in mice, hamsters, rats, chickens, dogs, and pigs. [2,3] There have also been conducted 19 randomized, double-blind, placebo-controlled studies in humans that have yielded varying results. [2] Despite of that, CLA is widely advertised and promoted for its fat reducing effect. Lots of weight-loss food supplements contain CLA alone or in combination with other substances.

OBJECTIVES

The goal of our study is to review the scientific evidence for CLA fat-reducing effect, to investigate the number and content of CLA-containing food supplements on the Bulgarian market and to evaluate the information available in the leaflets and outer package related to safety use.

METHODS

CLA-safety information was searched in PubMed, Scopus, Wiley Online Library, Science Direct, Embase and Internet. The search was performed with the following key words: conjugated linoleic acid, body composition, safety and side effects.

RESULTS

A total of 11 publications on CLA fat reducing effect and 7 publications related to CLA safety were selected.

CLA is often recommended for weight reduction or improving body composition (ratio of muscle to fat) but the evidence from studies is conflicting. [4-12] One meta-analysis concluded that, when taken at a dose of 3.2 grams per day, CLA slightly reduces body fat levels.[13] In one study, a combination of CLA and chromium failed to improve body composition.[14] CLA is believed to be a safe nutritional substance.[15] However, there are some safety concerns with its use. Use of CLA by people with diabetes may worsen blood sugar control and in overweight people without diabetes, CLA might decrease insulin sensitivity.[10, 16,17] Two studies suggested increased cardiovascular risk [18,19] Concerns have also been raised regarding use of CLA by nursing mothers. [20] 13 CLA-containing food supplements are present at the Bulgarian market. Only 4 of them are containing CLA only. The rest (69.23 %) are combination products. Most frequent CLA is combined with green tea extract, L-carnitin, Pinus korienensis seed oil, caffeine etc. The CLA content varies from 6.2 mg to 800 mg/capsule. The maximum recommended dosage for two of the products was 3000 mg CLA daily. All products contained strong claims on fast fat-burning effect of CLA. The safety information on use of CLA by nursing women was included in 10 products (76.92%). Only 2 products contained information related to diabetes. One CLA-only product contained information on necessary addition of antioxidant in case of long use of CLA.

MAIN CONCLUSIONS

Although the scientific data regarding the fat-reducing effect of CLA are contradictory, the information in packaging of CLA-containing food supplements promises a lot in this respect. Better control and information dissemination are needed for safe use.

REFERENCES:

- Nicolosi RJ, Rogers EJ, Kritchevsky D, Scimeca JA, Huth PJ., Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery*. 1997;22(5):266-77
- Larsen TM, Toubro S, Astrup A. Efficacy and safety of dietary supplements containing conjugated linoleic acid (CLA) for the treatment of obesity-evidence from animal and human studies. *J Lipid Res*. 2003 Aug 16
- Belury MA. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:505-31
- West D. Reduced body fat with conjugated linoleic acid feeding in the mouse. *FASEB J*. 1997;11:A599.
- Ferreira M, Kreider R, Wilson M, et al. Effects of conjugated linoleic acid (CLA) supplementation during resistance training on body composition and strength [abstract]. *J Strength Cond Res*. 1997;11:280.
- Blankson H, Stakkestad JA, Fagertun H, et al. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *J Nutr*. 2000;130:2943-2948.
- Riserus U, Berglund L, Vessby B. Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001;25:1129-1135.
- Thom E, Wadstein J, Gudmundsen O. Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. *J Int Med Res*. 2001;29:392-396.
- Gaullier JM, Halse J, Høye K et al. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:1118-1125.
- Larsen TM, Toubro S, Astrup A. Efficacy and safety of dietary supplements containing conjugated linoleic acid (CLA) for the treatment of obesity-evidence from animal and human studies. *J Lipid Res*. 2003.
- Larsen TM, Toubro S, Gudmundsen O, et al. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y does not prevent weight or body fat regain. *Am J Clin Nutr*. 2006;83:606-612.

Gaullier JM, Halse J, Høye K, et al. Supplementation with conjugated linoleic acid for 24 months is well tolerated by and reduces body fat mass in healthy, overweight humans. *J Nutr*. 2005;135:778-784.

Whigham LD, Watras AC, Schoeller DA. Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: a meta-analysis in humans. *Am J Clin Nutr*. 2007;85:1203-1211.

Diaz ML, Watkins BA, Li Y, et al. Chromium picolinate and conjugated linoleic acid do not synergistically influence diet- and exercise-induced changes in body composition and health indexes in overweight women. *J Nutr Biochem*. 2007 May 23.

Whigham LD, O'Shea M, Mohede IC, et al. Safety profile of conjugated linoleic acid in a 12-month trial in obese humans. *Food Chem Toxicol*. 2004;42:1701-1709.

Riserus U, Arner P, Brismar K, et al. Treatment with dietary trans-10cis-12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2002;25:1516-1521.

Moloney F, Yeow TP, Mullen A, et al. Conjugated linoleic acid supplementation, insulin sensitivity, and lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*. 2004;80:887-895.

Taylor JS, Williams SR, Rhys R, et al. Conjugated Linoleic Acid Impairs Endothelial Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Dec 8.

Steck SE, Chalecki AM, Miller P, et al. Conjugated linoleic acid supplementation for twelve weeks increases lean body mass in obese humans. *J Nutr*. 2007;137:1188-1193.

Masters N, McGuire MA, Beerman KA, et al. Maternal supplementation with CLA decreases milk fat in humans. *Lipids*. 2002;37:133-138.

HEALING OF DUODENAL ULCER AFTER ERADICATION OF HELICOBACTER PYLORI

S. Efremova¹, D. Efremova²

¹ University Clinic for surgical diseases "St. Naum Ohridski", Skopje;

² DOOEL "ReplekFarm", Skopje

INTRODUCTION

Infection with *Helicobacter pylori* is the primary reason for duodenal ulcer disease and its eradication leads to a significant reduction of ulcer relapse. Material and methods: We analyzed 48 patients with positive finding of *Helicobacter pylori* and duodenal ulcer who meet the criteria of the study. Standard therapy of patients with ulcer is a one week triple therapy that contains: 1) a proton pump inhibitor such as omeprazole, or pantoprazol rabeprazol 2) antibiotics, clarithromycin and amoxicillin or tinidazol for patients who are allergic to penicillin, 3) metronidazole. We do not recommend using just one drug. The presence of *Helicobacter pylori* confirm the IMMULITE 1000 analyzer for qualitative detection of IgG *Helicobacter pylori*-antibody in samples of serum or plasma. The patients underwent endoscopy after they were initially treated with one week standard triple therapy and endoscopy was performed after 6 weeks for verification of the eradication and healing of the ulcer.

RESULTS

The rates of eradication and ulcer healing 6 weeks after treatment were as follows: recovery of the ulcer was present in 40 patients, and the other 8 patients were reevaluated after 6 months. These patients after 6 months had no symptoms and decline in titre of IgG *Helicobacter pylori* antibodies.

CONCLUSION

6 months after treatment 40 patients were "cured" and 8 in group reevaluated. Positive serology can be sent as an indicator of possible ulcer relapse, especially when it occurs along with repeated symptoms. It seems justified in such situations to repeated treatment with different therapies and expects this to be useful in many patients from that group.

REFERENCES

- Bianchi Porro G, Lazzaroni M, Bargiggia S, Maconi G, Trespi E, Perego M, Alvisi C,

Villani L, Luinetti O, Fiocca R, Franceschi M, Cesana B, Solcia E. Omeprazole coupled with two antibiotics for Helicobacter pylori eradication and prevention of ulcer recurrence. *Am J Gastroenterol.* 1996 Apr;91(4):695-700.

Vilaichone RK, Mahachai V, Tumwasorn S, Nunthapisud P, Wisedopas N, Kullavanijaya P. Duodenal Helicobacter pylori associated duodenal ulcer depend on gastric Helicobacter pylori status. *J Med Assoc Thai.* 2002 Jun;85 Suppl 1:S97-102.

Butorov IV, Osoianu IuP, Maksimov VV, Butorov SI. Medical, social, and economic effectiveness of treatment of day-case patients with peptic ulcer. *Klin Med (Mosk).* 2006;84(1):53-6.

Cho SJ, Choi IJ, Kim CG, Kook MC, Lee JY, Kim BC, Ryu KH, Nam SY, Kim YW. Risk factors associated with gastric cancer in patients with a duodenal ulcer. *Helicobacter.* 2010 Dec;15(6):516-23.

Villani L, Luinetti O, Fiocca R, Franceschi M, Cesana B, Solcia E. Omeprazole coupled with two antibiotics for Helicobacter pylori eradication and prevention of ulcer recurrence. *Am J Gastroenterol.* 1996 Apr;91(4):695-700.

Vilaichone RK, Mahachai V, Tumwasorn S, Nunthapisud P, Wisedopas N, Kullavanijaya P. Duodenal Helicobacter pylori associated duodenal ulcer depend on gastric Helicobacter pylori status. *J Med Assoc Thai.* 2002 Jun;85 Suppl 1:S97-102.

Butorov IV, Osoianu IuP, Maksimov VV, Butorov SI. Medical, social, and economic effectiveness of treatment of day-case patients with peptic ulcer. *Klin Med (Mosk).* 2006;84(1):53-6.

Cho SJ, Choi IJ, Kim CG, Kook MC, Lee JY, Kim BC, Ryu KH, Nam SY, Kim YW. Risk factors associated with gastric cancer in patients with a duodenal ulcer. *Helicobacter.* 2010 Dec;15(6):516-23.

ЗАЗДРАВУВАЊЕ НА ДУОДЕНАЛНИОТ УЛКУС ПО ИСКОРЕНУВАЊЕТО НА HELICOBACTER PYLORI

С. Ефремова¹, Д. Ефремова²

¹ Универзитетска клиника за хируршки болести „Св. Наум Охридски“, Скопје;
² ДООЕЛ „РеплекФрам“, Скопје

ВОВЕД

Инфекцијата со Helicobacter pylori претставува примарна причина за улкусната болест на дуоденумот и нејзината искоренетост води до значајно намалување на рецидивот на улкусот.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Анализираме 48 пациенти со позитивен наод на Helicobacter pylori и со дуоденален улкус кои ги исполнуваа критериумите на студијата. Стандардна терапија на болните од улкус е еднонеделна тројна терапија која содржи: 1) инхибитор на протонската пумпа како што се омепразол, пантопрозол или рабепразол; 2) антибиотици, кларитромицин и амоксицилин или тинидазол за пациенти кои се алергични на пеницилини; 3) метронидазол. Не се препорачува користење на само еден медикамент. Присуството на Helicobacter pylori го потврдуваме со IMMULITE 1000 анализер за квалитативна детекција на IgG Helicobacter pylori-антитела во примероци на серум или плазма. Болните беа ендоскопирани на почетокот, третирани со стандардната еднонеделна тројна терапија и ендоскопирани по 6 недели за верификација на искоренувањето и заздравувањето на улкусот.

РЕЗУЛТАТИ

Стапките на искоренување и заздравување на улкусот 6 недели по третманот беа следниве: заздравување на улкусот беше присутно кај 40 пациенти, а останатите 8 пациенти беа реевалуирани по 6 месеци. Овие пациенти по 6 месеци немаа симптоми и имаа пад на титарот на IgG Helicobacter pylori антителата.

ЗАКЛУЧОК

6 месеци по третманот вкупно 40 пациенти беа “излечени” и 8 во групата на реевалуација. Позитивната серологија може да се прати како индикатор за можен улкусен рецидив, особено кога се јавува заедно со повторени симптоми. Се чини оправдано во такви ситуации да се повтори третманот со различни терапии и се очекува ова да биде корисно кај многу пациенти од таа група.

ЛИТЕРАТУРА

Bianchi Porro G, Lazzaroni M, Bargiggia S, Maconi G, Trespi E, Perego M, Alvisi C,

EXAMINATION OF GLUTATHIONE PROTECTIVE ROLE IN ACUTE INTOXICITY BY LEAD AND CADMIUM VIA ACTIVITY OF THE LIVER ENDONUCLEASES

R.S. Nikolić¹, J.M. Jovanović¹, N.S. Krstić¹, M.N. Stanković¹, G.M. Kocić²

¹ University of Niš, Faculty of Science and Mathematics, Department of Chemistry, Višegradska 33, 18000 Niš, Serbia

² University of Niš, Faculty of Medicine, Bulevar dr Zorana Đinđića 81, 18000 Niš, Serbia

INTRODUCTION

Heavy metal are pollutants of significant ecological concern cause they are not biodegradable and have long halflives in the soil Ways of Pb and Cd intake in the body include contaminated food, water and air. As a metal with a cumulative effect Pb is competitive with essential metals (Fe, Ca, Cu, Zn) for their various functions in the body, especially those related to the presence of free-SH groups as part of the biomolecules of proteins and enzymes (1). Cadmium contaminated food after intake can cause the gastrointestinal dysfunctions. The systematic exposure to Cd leading increas Ca excretion, the risk of appearing kidney stones and bone damage (2).

According to physicochemical properties Pb and Cd easily inhibit the physiological activity of the enzyme with active -SH groups.

Glutathione (GSH) is a tripeptide L-γ-glutamyl-L-cysteinyl-glycine (Fig. 1) which constitutes 90% of total nonprotein sulphur cellular compounds, and it is a essential cofactor of some enzymes. Glutathione as a chelating agent contains one thiol group (in reduced form) participating in formation of mercaptide bond with heavy metal ions like Zn, Cu, Cd, Pb and Ag (3).

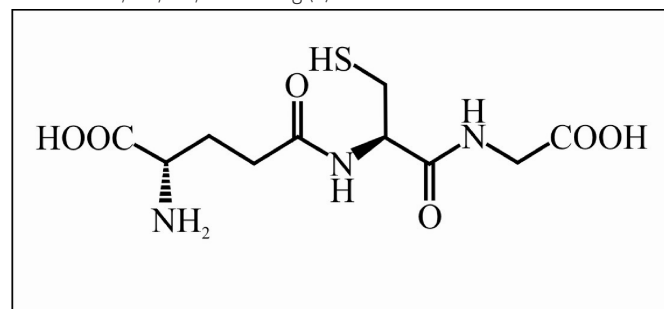


Fig. 1: Structural formula of glutathione

Liver endonucleases (acid and alkaline DNase) are hydrolases that degrade both native, and denatured DNA molecules. The main role of

DNase is reflected in the regulation of synthesis and degradation of endogenous and exogenous DNA, modified DNA in repair and removal of circulating DNA from the organism. According to the literature, DNase are considered as the main executors of apoptosis, responsible for internucleosomal fragmentation of DNA cellular in apoptosis. Internucleosomal DNA fragmentation, as a biochemical marker of apoptosis, presents separation of chromosomal DNA into fragments oligonucleosome size (4).

This study was performed in order to investigate the protective role of GSH, in acute intoxicity by Pb and Cd, via the activity of liver endonucleases (acid and alkaline DNase).

MATERIALS AND METHODS

Materials

The research was carried out on white Wistar female rats, 6 weeks old, weight 220±20 g. The experimental animals were raised in the laboratory conditions on a normal dietary regime in the vivarium on Faculty of Medicine, University of Niš. During three weeks of the experiment animals were dosing treated with CdCl₂ and Pb(CH₃COO)₂ injected intraperitoneally. Total doses were below the lethal dose (Pb <0.1 g/kg, Cd <1 mg/kg), with appropriate control group and group that beside Cd and Pb was treated with GSH (20 mg/kg). Biological material were analyzed according to the working standards in biochemical laboratories.

Methods

The liver endonuclease activity was measured spectrophotometrically in 10% homogenate, according to the method of Bartholeyns (5).

Statistical analysis. Statistical data were interpreted using the Student's t-test (Microsoft Office Excel).

RESULTS AND DISCUSSION

Result of the determination acid and alkaline DNase activity of experimental animals that were intoxicated with CdCl₂ and Pb(CH₃COO)₂, as well as the results of measurements of these compounds in the presence of LA, are shown in Figure 2 for acid, and Figure 3 for alkaline DNase, as mean value ± SD in international units per gram of protein.

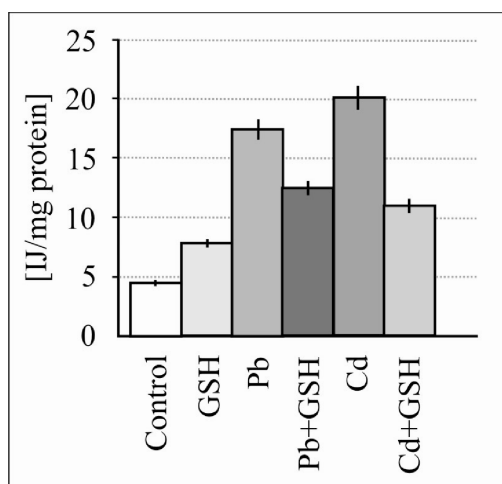


Fig. 2: Results of the determination acid DNase activity

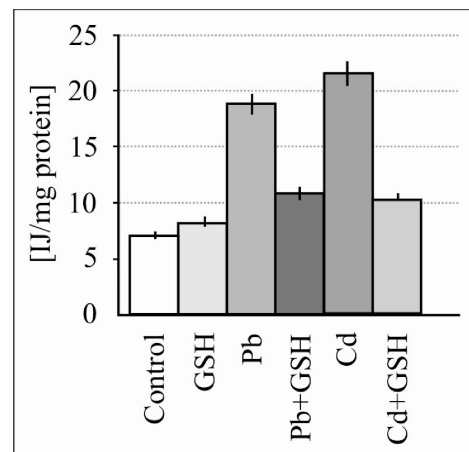


Fig. 2: Results of the determination alkaline DNase activity

Results of the determination liver enzymes activity showed that Pb and Cd multiply and statistically significant, increase the value of these enzymes ($p < 0.01$). It is assumed that Cd probable cause oxidative damage of DNA, proteins and lipids, which lead to apoptosis. Cd can cause increased production of free radicals, so we can talk about the genotoxic effects of metals on the enzymatic and nonenzymatic components of antioxidant defense system of the organism. DNA damages and genotoxic effects in the cell can be increased when the cells are exposed to the influence of Pb, leading to the activation of DNase, which will participate in the degradation of DNA as the ultimate effect of activation of apoptosis, i.e. programmed cellular death (4). The addition of GSH, a day after exposure to these metals during the experiment, partly reduce the effect of poisoning, because GSH forms complex compound with metal ions. Probably, structure of the complex *GSH-heavy metal ions* is $M(GSH)_2$. Stability of the complex *GSH-heavy metal ions* depends on the latter size, acid-base properties and thiol group affinity that decreases in the order: $Cd^{2+} > Pb^{2+} > Cu^+/Cu^{2+}$, so the effect of "blocking" Cd is more pronounced.

CONCLUSIONS

GSH is an effective detoxicant because it has a free -SH group through which can build a stable mercaptide, so block the heavy metals and reduces their toxic effects.

REFERENCES

- Sayeda AL, Newairy A, Protective role of flax lignans against lead acetate induced oxidative damage and hyperlipidemia in rats. *Food Chem. Tox.* 2009; 47: 813-818.
- Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, Groneberg DA, The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health, *J. Occup. Med. Toxicol.* 2006; 1(22): doi: 10.1186/1745-6673-1-22.
- Poteč-Pawlak K, Ruzik R, Lipiec E, Investigation of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) complexation by glutathione and its component amino acids by ESI-MS and size exclusion chromatography coupled to ICP-MS and ESI-MS, *Talanta* 2007; 72: 1564-1572.
- Counis MF, L-DNase II, a Molecule That Links Proteases and Endonucleases in Apoptosis, Derives from the Ubiquitous Serpin Leukocyte Elastase Inhibitor. *Mol. Cell. Biol.* 1998; 18: 3612-3619.
- Kocić G, Pavlović D, Pavlović R, Nikolić G, Cvetković T, Stojanović I, Kocić R, Sodium nitroprusside and preoxynitrite effect on hepatic DNases: An *in vitro* and *in vivo* study. *Comp. Hepatol.* 2004; 3(6): 1-9.

QUALITY AND SAFETY OF ADDITIVES IN MEAT PRODUCTS

Jakimova D.¹, Angelova S.¹, Kadifkova Panovska T.²

¹Centar Of Public Health, Kumanovo, R. Macedonia

²Faculty of Pharmacy, Skopje, R. Macedonia

Additives that are contained in food products have to fulfill the following conditions: to be added in sufficient quantity; not to influence significantly in nutrition value of the product; to be able to identify and determine their quantity; not be harmful for human health if their use is technologically approved. The additives type and quantity needs to be labeled on the original package.

In meat products which are temperature processed, are added mixture of additive which contain: polyphosphates, monosodium glutamate, proteins, aromatics, ascorbic acid etc. Use of these substances is regulated by Rulebook on additives that can be used for food production, Gazette 118/2005. According to this Rulebook the allowed concentration of added phosphates expressed as diphosphorus pentoxide in meat products should not exceed 0.3%. Polyphosphates are added in order to improve the technological properties of products. In additives composition the common concentration of polyphosphates is in range between 18 and 25%, expressed as diphosphorus pentoxide, The use of polyphosphates as additives in food industry, from technological point of view, have shown many advantages. However, the health issue has to be covered considering the fact that polyphosphates can be very harmful. Many authors consider that consumption of polyphosphates through food can cause depletion of minerals as: calcium, iron, copper, magnesium etc. These elements bind with polyphosphates and are eliminated through feces as non-hydrolyzed polyphosphates. Even though these substances are taken in minor quantity, that can be potentially harmful for human health.

The aim of this study is to determine the concentration of polyphosphates in additive samples and the safety of their use by determining toxic elements.

In this research there have been covered 9 samples of imported additives for meet industry, delivered by The Agency for Food and Veterinary. The identification of the additives is made through determination of: 1. Organoleptic properties - white, yellow or red powder substances with characteristic odor, without impurities and water-soluble. 2. Quality chemical reactions: a) 1 % solution of phosphorous compound with one or many phosphorus atoms, in reaction with AgNO₃ produces yellow sediment (orthophosphates) and white sediment (soluble in HNO₃), respectively; b) 5 ml solution of phosphates (1%) in reaction with 1 ml HNO₃ and 5 ml ammonium molybdate produces luminous yellow sediment of ammonium phosphomolybdate.

Phosphates¹ after preliminary preparation are determined by Merck's Spectroquant phosphate-Test.

Purity and safety of additives is determined by the following parameters: pH of 1% solution, lead, cadmium and fluoride. Lead and cadmium are determined by Atomic Absorption Spectrometry with graphite cuvette (AAAnalyst 600, Perkin Elmer). Fluorides² are determined by Ion Analyzer Mettler Toledo 355.

According to Rulebook on additives for food, MAC for lead is 5.0 mg/kg, MAC for cadmium is 1.0 mg/kg, and MAC for fluorides is 10.0 mg/kg. From the obtained results it can be seen that the average value for

phosphates (expressed as diphosphorus pentoxide) is 18.9% (min 17.4%, max 20.8%). Out of 9 examined samples, lead was determined in 4 samples with average value of 0.016 mg/kg (min 0.01 mg/kg, max 0.02 mg/kg). Cadmium was determined in 8 samples with average value of 0.006 mg/kg (min 0.005 mg/kg, max 0.012 mg/kg). Fluoride ion was determined in all samples with average value of 1.2 mg/kg (min 1.05 mg/kg, max 1.34 mg/kg).

The obtained results lead to a conclusion that this group of additives has appropriate quality regarding the presence of polyphosphates. The presence of lead, cadmium and fluorides in additives vary in the allowed range according to The Rulebook on Additives, therefore they can not be potential source of impurities.

^{1,2}Accredited method

REFERENCES

1. Rulebook for General Requirement for food safety (Gazette 118/2005)
2. Rulebook for additives for food production (Gazette 118/2005).
3. Specifications for Identity and Purity of Food Additives, Vol.VII. Emulsifiers, Stabilizers, Bleaching and Maturing Agents, FAO/WHO, Roma 1965-2.

КВАЛИТЕТ И БЕЗБЕДНОСТ НА АДТИВИ ЗА ПРОИЗВОДИ ОД МЕСО

Јакимова Д.¹, Ангелова С.¹, Кадифкова Пановска Т.²

¹Центар за Јавно Здравје Куманово, Р. Македонија

²Фармацевтски факултет, Скопје, Р. Македонија.

Адитивите кои се додаваат во прехранбените производи мора да ги исполнуваат следните услови: да се додаваат во неопходно потребни количини; значително да не влијаат на хранливата вредност на производот; да можат да се идентификуваат и определат нивните количини; да не се штетни по здравјето на човекот ако нивната употреба технолошки е оправдана. На оригиналното пакување на производот треба да е назначен видот и количината на адитивот. Во производите од месо кои термички се обработуваат се додаваат смеси на адитиви со состав: полифосфати, моносодиум глутаминат, протеин, аромати, аскорбинска киселина и др. Употребата на овие супстанции се регулира со Правилникот за адитивите што можат да се употребуваат за производство на храна, Сл.весник 118/2005. Според истиот Правилник дозволената концентрација на додадени фосфати, изразена како дифосфор пентоксид во производите од месо треба да не е повеќе од 0.3% Полифосфатите се додаваат за да ги подобрат технолошките својства на производите. Во составот на адитивите, полифосфатите најчесто се во концентрација помеѓу 18 и 25 %, изразено како дифосфор пентоксид. Употребата на полифосфатите како адитиви во прехранбената индустрија од технолошки аспект има многу предности. Меѓутоа, употребата на полифосфатите треба да се опфати и од аспект на штетност, т.е. како здравствен проблем. Многу автори сметаат дека внесувањето на полифосфатите со прехранбените производи може да предизвика губење на минерали како: калциум, железо, бакар, магнезиум и др. Наведените елементи се врзуваат на полифосфатите, кои се губат преку фецесот, како нехидролизирани полифосфати. Иако овие супстанции се внесуваат во организмот во мали количини, тие можат да бидат извор на очистувања, т.е. да бидат потенцијално опасни по здравјето на човекот.

Целта на овој труд е да ја определиме концентрацијата на полифосфати во одредени примероци на адитиви, како и безбедноста, преку определувањето на некои токсични елементи.

Во испитувањето се опфатени 9 видови на адитиви за месната индустрија, доставени од Агенцијата за храна и ветеринарство при увоз. Направена е идентификација на адитивите, преку определувањето на: 1. Органолептички својства - бели, жолтеникави или црвеникави прашкасти супстанции со определен мирис и без видливи онечистувања, лесно растворливи во вода; 2. Квалитативни хемиски реакции: а) 1% раствор на фосфатен препарат дава со сребро нитрат жолт талог (ортофосфати), а бел талог за фосфати со два или повеќе атоми на фосфор во молекулата кој е растворлив во разредена азотна киселина; б) со мешање на 5 ml на 1% раствор на фосфати со 1 ml разреден раствор на азотна киселина и 5 ml на амониум молибдат, се добива сјаен жолт талог на амониум-фосфо-молибдат.

Фосфатите¹ со претходна подготовка ги определуваме со Spectroquant phosphate-Test на Merck.

Чистотата и безбедноста на адитивите е определена со следните параметри: рН на 1% раствор, олово, кадмиум и флуорид. Оловото и кадмиумот се определени со Атомска апсорпциона спектрометрија, графитна кивета (AAAnalyst 600, Perkin Elmer). Флуоридите² се определени со Јон анализатор Mettler Toledo 355.

Според Правилникот за адитивите што можат да се употребуваат за производство на храна, специфични критериуми за чистота на адитивите, дозволената концентрација за олово е не повеќе од 5.0 mg/kg, за кадмиум не повеќе од 1.0 mg/kg, а за флуорид не повеќе од 10.0 mg/kg.

Од добиените резултати се гледа дека најниската вредност за фосфати (изразена како дифосфор пентоксид) е 17.4%, највисоката вредност е 20.8%, а средната вредност 18.9%. Оловото беше определено кај четири примероци, а кај пет примероци не беше докажано. Кај примероците кои беа тестирани на олово, најниската вредност е 0.01 mg/kg, највисоката вредност е 0.02 mg/kg, а средната вредност е 0.016 mg/kg. Кадмиумот беше определен кај 8 примероци. Најниската вредност е 0.005 mg/kg, највисоката вредност е 0.012 mg/kg, а средната вредност 0.006 mg/kg. Флуоридниот јон беше присутен кај сите примероци. Најниската вредност е 1.05 mg/kg, највисоката вредност е 1.34 mg/kg, а средната вредност 1.2 mg/kg.

Според добиените резултати заклучивме дека оваа група на адитиви се соодветен квалитет, во однос на присуство на полифосфати. Во однос на оловото, кадмиумот и флуоридите оваа група на адитиви не може да биде потенцијален извор на онечистување. Резултатите од испитувањето на поедините елементи од безбедност се во граница на дозволеното според Правилникот за адитиви.
^{1,2} Методите се акредитирани

ЛИТЕРАТУРА

1. Правилник за општите барања за безбедност на храната (Сл.весник 118/2005)
2. Правилник за адитивите што можат да се употребуваат за производство на храна (Сл.весник 118/2005).
3. Specifications for Identity and Purity of Food Additives, Vol.VII. Emulsifiers, Stabilizers, Bleaching and Maturing Agents, FAO/WHO, Roma 1965-2.

ENHANCED HEALTH BENEFITS OF MACEDONIAN RED WINES ASSOCIATED TO COLOR CHARACTERISTICS, ANTHOCYANINS AND TOTAL POLYPHENOLS

Maja Dimitrovska¹, Mirjana Bocevska², Igor Spiroski¹

¹Institute of Public Health of Republic of Macedonia, 50. Divizija, 6, Skopje,

²Department of Food Technology and Biotechnology, Faculty of Technology and Metallurgy, Rudjer Boskovic, 16, Skopje

The intake of antioxidant compounds present in food is an important health-protecting factor. Red wine is recognized as a considerable source of polyphenolic substances, which are well-known antioxidants. They ensure optimal free radical scavenging activity and protect the tissues from oxidative damage. There are lots of reports that antioxidant properties of wines are associated to their anthocyanins content and color characteristics. However, some authors believe that the concentration of total polyphenols is responsible for wines effects on health protection known as French paradox.

The objective of this study was to evaluate the profile of some Macedonian red wines of different varieties, Vranec, Merlot, Cabernet Sauvignon and Pinot Noir with regard to their total phenols content, individual anthocyanins, color properties and antioxidant capacity. For that purpose, several representative samples of wines from local wineries of the vintages 2004-2008 were taken and tested. The color characteristics of the wines were determined by spectrophotometry and total polyphenol content using Folin-Ciocalteu reagent. For individual anthocyanin content HPLC-UV was used, whereas the total content of anthocyanins was measured according to Boulton. The wines antioxidant potential was evaluated using the DPPH method. The tested wines demonstrated different chromatic profile which was strongly related to the grape variety and the year of production. Concentrations in the range of 23-59 mg/100ml for total phenols were obtained. The higher concentrations of total phenols were confirmed in wines with higher color intensity. Vranec variety wines were the richest in total anthocyanins, followed by Merlot and Cabernet Sauvignon. In younger wines higher content of free anthocyanins were determined compared to older ones. The antiradical activity (I_{50%}) was in the range of 12-59 ml wine, and was highly influenced by the content of total polyphenols. Vranec wines have shown high antioxidant potential, which presents evidence that some red wines may provide enhanced health benefits for the consumers.

REFERENCES:

1. Arnous A., Makris D., Kefalas P. (2001) Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines, J. Agric. Food. Chem., 49:5736-5742
2. Cimino F., Sulfaro V., Trombetta D., Saija A., Tomaino A. (2007) Radical-scavenging capacity of several Italian red wines, Food Chem., 103: 75-81
3. Cliff M. A., King M.C., Schlosser J. (2007) Anthocyanin, Phenolic Composition, Colour Measurement and Sensory Analysis of BC Commercial Red Wines, Food Res. International, 40: 92-100

ПОВОЛНИТЕ ЗДРАВСТВЕНИ ЕФЕКТИ НА МАКЕДОНСКИТЕ ЦРВЕНИ ВИНА ВО КОРЕЛАЦИЈА СО БОЈАТА, АНТОЦИЈАНИТЕ И ВКУПНИТЕ ПОЛИФЕНОЛИ

Маја Димитровска¹, Мирјана Боцевска²,
Игор Спироски¹

¹Институт за јавно здравје на Република Македонија,
50. Дивизија 6, Скопје

²Институт за прехранбена технологија и биотехнологија,
Технолошко-металуршки факултет, Руѓер Босшковиќ, 16, Скопје

Внесот на антиоксиданси преку исхраната е значаен фактор кој придонесува кон заштита на здравјето. Црвеното вино се смета за богат извор на полифенолни соединенија кои се добро познати антиоксиданси. Тие ги штитат крвта од оксидативен стрес и оштетување со својата активност на ловене на слободните радикали. Постојат повеќе студии во кои антиоксидативните својства на вината се поврзуваат со нивната боја и содржината на антоцијани. Некои автори сметаат дека концентрацијата на вкупни полифеноли во вината е клучна за нивните поволни здравствени ефекти, познати како Француски парадокс. Целта на овој труд беше да се одреди профилот на некои македонски црвени вина добиени од различни сорти на грозје, Вранец, Мерло, Каберне Совињон и Пино Ноар во однос на нивната содржина на вкупни феноли, поединечни антоцијански соединенија, колорните карактеристики и антиоксидативниот потенцијал. За таа цел, беа обезбедени неколку репрезентативни примероци на црвени вина од локалните винарници добени во текот на реколтите 2004-2008 год. и тестирани. Колорните карактеристики на вината беа одредувани спектрофотометриски, а содржината на вкупни полифеноли со Folin-Ciocalteu методот. Течна хроматографија под висок притисок со UV детекција се користеше за одредување на поединечните антоцијани, а содржината на вкупни антоцијани беше измерена и со методот по Boulton. Антиоксидативниот потенцијал на вината беше одреден со примена на DPPH методот. Тестираните вина покажаа различни хроматски профили што е во голема мерка поврзано со реколтата кога се произведени и сортата на грозје од која се добиени. За содржината на вкупни феноли беа добиени концентрации во опсегот од 23-59 mg/100ml. Утврдивме дека повисоки концентрации на вкупни феноли се добиваат кај вината со повисок интензитет на боја. Вината од сортата Вранец беа најбогати со вкупни антоцијани, следени од Мерло и Каберне Совињон. Кај помладите вина, содржината на слободни антоцијани беше повисока во споредба со одлежаните вина. Антирадикалната активност (I50%) на испитаните вина се движеше во опсегот од 12-59 ml wine и беше во силна корелација со содржината на вкупни полифеноли. Вината од сортата Вранец покажаа највисок антиоксидативен потенцијал што укажува на тоа дека некои црвени вина би можеле да придонесат кон здравствената состојба на консументите.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arnous A., Makris D., Kefalas P. (2001) Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines, *J. Agric. Food Chem.*, 49:5736-57422. Cimino F., Sulfaro V., Trombetta D., Saija A., Tomaino A. (2007) Radical-scavenging capacity of several Italian red wines, *Food Chem.*, 103: 75-813. Cliff M. A., King M.C., Schlosser J. (2007) Anthocyanin, Phenolic Composition, Colour Measurement and Sensory Analysis of BC Commercial Red Wines, *Food Res. International*, 40: 92-100

DETERMINATION OF COENZYME Q10 CONTENT IN DIETARY SUPPLEMENTS AND RAW MATERIALS USING HPLC-DAD

Maја Dimitrovska¹, Biljana Culeva¹,
Anita Najdenkoska¹

¹Laboratory of Food Safety and Control, Institute
of Public Health of Republic of Macedonia, 50 Divizija, 6, Skopje

Coenzyme Q10 (ubiquinone, ubidecarenone) is a biologically active compound that is similar in chemical structure to menaquinones (vitamin K2). It is found in numerous cellular structures within the body, including the endoplasmic reticulum, lysosomes and mitochondria, where it is an important part of the electron transport chain. Because of its ability to transport electrons it is considered as potent antioxidant with numerous health benefits. There is some evidence that CoQ10 supplementation could help to prevent and/or treat some diseases including cancer, AIDS, Parkinson's disease, and neurodegenerative diseases, and it also seems to be an energy booster and immune system enhancer. However, these data are still needed to be confirmed.

As a result of these recent findings, a large number of dietary supplements containing CoQ10 have currently emerged on the market in Macedonia. These products include softgels, hardshell capsules, and tablets. CoQ10 may be present as a single active compound or in combination with other active ingredients, such as plant extracts, vitamins or oils.

In this work, dietary supplements containing coenzyme Q10 of six different brands sold over the counter in Macedonia and one raw material were tested to check the content of the active ingredient claimed on the label. The samples, representing hardshell gelatin capsules and tablets were previously extracted by sonication with a suitable solvent and submitted to HPLC analysis using a C18 column. The mobile phase consisting of absolute ethanol and 2-propanol was delivered isocratically. Detection was carried out using DAD detector at 275 nm and quantitation was performed by using external CoQ10 standard and calibration curve.

It was observed that replacement of the absolute ethanol with 96% ethanol in the mobile phase gave unsatisfactory results concerning the retention time of the analyte of interest. No matrix effects influenced the separation, so detection and quantification was unambiguous. The results of the study demonstrated that there were no deviations from the manufacturer's indicated content of coenzyme Q10 in all the tested dietary supplements.

REFERENCES

1. Lunetta S., Roman M. (2008) Determination of coenzyme Q10 content in raw materials and dietary supplements by high-performance liquid chromatography-UV: collaborative Study, *JAOAC Int.*, 91(4): 702-708
2. Kettawan A., Kunthida C., Takahashi T., Kishi T., Chikazawa J., Sakata Y., Yano E., Watabe K., Yamamoto Y., Okamoto T. (2007) The quality control assessment of commercially available coenzyme Q10-containing dietary and health supplements in Japan, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 41:124-131
3. Rodriguez-Acuña R., Brenne E., Lacoste F. (2008) Determination of coenzyme Q10 and Q9 in vegetable oils, *J.Agric. Food Chem.*, 56: 6241-6245

ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА СОДРЖИНАТА НА КОЕНЗИМ Q10 ВО ДОДАТОЦИ НА ИСХРАНАТА И СУРОВИНСКИ МАТЕРИЈАЛИ СО ПРИМЕНА НА HPLC-DAD

Маја Димитровска, Билјана Чулева,
Анита Најденкоска

Лабораторија за испитување на храна, Институт
за јавно здравје на Република Македонија, 50. Дивизија, 6, Скопје

Коензимот Q10 (убихинон, убидекаренон) е биолошки-активно соединение кое е слично по хемиска структура со менахиноните (витамин К). Се среќава во поголем број клеточни структури, вклучително и во ендоплазматскиот ретикулум, лизозомите и митохондриите, каде што има значајна улога во ланецот на транспорт на електрони. Заради неговата способност да пренесува електрони, коензимот Q10 се смета за моќен антиоксидант со значителен здравствен придонес. Постојат извесни податоци дека вклучувањето на коензим Q10 како додаток во исхраната е поврзано со спречување и/или лекување на некои болести како канцер, СИДА, Паркинсонова болест и невродегенеративни заболувања. Исто така, ова соединение се смета како енергетски промотор и зајакнувач на имунолошкиот систем. Сепак, неопходно е сите овие податоци да се потврдат со дополнителни истражувања. Како резултат на горенаведените скорешни сознанија, во последно време на пазарот во Македонија се зголеми бројот на додатоци на исхраната кои содржат коензим Q10. Во овие продукти спаѓаат меки и тврди капсули и таблети, во кои коензимот може да е присутен како единечна активна компонента или во комбинација со други активни состојки како растителни екстракти, витамини или масла. Во ова истражување беа тестирани 6 типови додатоци на исхрана од различни производители, кои се продаваат без лекарски рецепт во аптеките во Македонија и еден суровински материјал со цел да се провери содржината на коензим Q10 декларирана на етикетата на производот. Примероците кои претставуваат тврди желатински капсули и таблети претходно беа екстрахирани на ултразвучна бања со соодветен растворувач. Потоа беше извршена хроматографска анализа на екстрактот на C18 колона. Раздвојувањето на компонентите се постигна со изократно пумпање на мобилната фаза составена од апсолутен етанол и 2-пропанол. Компонентата од интерес ја детектиравме со употреба на ДАД детектор на бранова должина од 275nm. Квантифицирањето беше извршено со помош на надворешен стандард на коензим Q10 и конструирање на калибрациона крива. Беше утврдено дека замената на апсолутниот етанол со 96% етанол во мобилната фаза не дава задоволителни резултати во однос на ретенционото време на анализот на интерес. Интерференции од матриксот на препаратите не беа забележани, така што детекцијата и квантификацијата на коензимот Q10 беа недвосмислени. Резултатите од испитувањето покажаа дека отстапувањата од декларираната содржина на коензим Q10 кај сите тестирани додатоци на исхрана се во рамките на дозволеното.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lunetta S., Roman M. (2008) Determination of coenzyme Q10 content in raw materials and dietary supplements by high-performance liquid chromatography-UV: collaborative Study, *JAOAC Int.*, 91(4): 702-7082. Kettawan A., Kunthida C., Takahashi T., Kishi T., Chikazawa J., Sakata Y., Yano E., Watabe K., Yamamoto Y., Okamoto T. (2007) The quality control assessment of commercially available coenzyme Q10-containing dietary and health supplements in Japan, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 41:124-1313. Rodríguez-Acuña R., Brenne E., Lacoste F. (2008) Determination of coenzyme Q10 and Q9 in vegetable oils, *J. Agric. Food Chem.*, 56: 6241-6245

JUSTIFICATION OF THE USE OF FUNGI IN NUTRITION

Mileva Elena, Stefanoska Anita,
Biljana Bauer Petrovska

Faculty of Pharmacy, University of St. Cyril and Metodi, Skopje

The number of fungi recorded in Republic of Macedonia is approximately 1500 species of which 1300 types belong to the Basidiomycota and 200 types of Ascomycota, and is believed to have around 10,000 species. Representatives which are eatable are about 500 but most of them are: *Amanita caesarea* (Scop.) Pers. (Caesar's Mushroom), *Agaricus bisporus* (Lge.) Sing. (Champignon), *Macrolepiota procera* (Scop.: Fr.) Sing. (Parasol Mushroom), *Boletus edulis* Bull (penny bun), *Lactarius deliciosus* (L. ex Fr.) SFGGray s (Saffron milk cap), *Cantharellus cibarius* Fr. (golden chanterelle) and others.⁽¹⁾ Registered human-toxic fungi are about 100 of which 20 are deadly poisonous, such as *Amanita muscaria* (L.: Fr.) Lam. (fly Amanita), *A. pantherina* (DC. ex Fr.) Krombh. (Panther cap), *A. phalloides* (Vaill. ex Fr.) Link (death cap), *A. verna* (Bull.: Fr.) Lam. (fool's mushroom) and many others.⁽¹⁾ Fungi are useful and delicious members of the biosphere. Today, they are considered as an alternative source of food for adequate nutrition. With their consumption comes to lowering serum cholesterol and 40% for four weeks. Wild and cultivated mushrooms are considered a good source of protein and protein level varies depending on the genetic structure of the fungus and chemical composition of the location where they grow. Generally cultivated fungi have higher amounts of protein in itself apart from the wild species. The content of trace elements varies depending on the type, location, composition and pollution of the soil of the part that has been reviewed.⁽²⁾ The fungi contain high levels of trace elements and heavy metals like copper and zinc and its presence should not be considered harmful, but rather like an excellent source of it.⁽³⁾ Vitamins are also present and most vitamins are from group B, then folic acid, vitamin D. We should not forget the essential amino acids that are also present in sufficient quantities.⁽⁴⁾ In this paper we are going to look at some details which are worked out literature data for six genera of fungi, such as: genus *Agaricus* (champignon), genus *Boletus* (wild mushrooms), genus *Lactarius* (spurge), genus *Morchella* (cup fungi), genus *Pleurotus* (oyster), genus *Lentinus* (shiitake). Of the tests performed on the mineral composition of the tested genera could be noted that the richest genus with trace elements, and excellent potassium / sodium ratio is *Boletus*.⁽³⁾ This genus is characterized by high accumulative abilities, so species that grow in soiled environment containing large amounts of heavy metals. Due to the increasing amount of metals, the content of other trace elements is reduced, thereby reducing the quality of mushrooms. Besides *Boletus*, genus *Pleurotus* contains high amounts of trace elements.⁽³⁾ For the genus *Agaricus* is known that due its preservation it loses significant amounts of potassium and zinc, so it is advisable to consume it fresh.⁽³⁾ Genera *Lentinus* and *Morchella* contain lower levels of trace elements.⁽³⁾ On the contents of trace elements influence has the pollution of the location of where the mushroom is gathered and accumulative abilities of the fungi, so in the genus *Boletus* was recorded the largest quantity of the them.⁽³⁾ Fungi despite the content of trace elements they contain significant amounts of nutrients. The genus *Pleurotus* contains high levels of nutrients, followed by the genus *Agaricus*.⁽⁴⁾ With the lowest nutritional value are genera *Lactarius* and *Lentinus*.⁽⁴⁾ Fresh species of the genus *Agaricus* are richer with protein than canned and cultivated. Also, their energy value is lower

due to lower fat content. Unlike the genus *Agaricus*, cultivated species of genera *Boletus* and *Pleurotus* are with higher nutritional value than wild species.⁽⁵⁾ In addition to keeping an eye on whether fungi are cultivated or not, an important role are the age of the fungus.⁽⁵⁾ Thus in the genera *Lactarius* and *Lentinus* should be preferred the younger species, unlike genus *Pleurotus* where more nutritional are the old species. Characteristic are that the genus *Lentinus* contains the highest value of fat, which has the highest energy value compared to other display genera.⁽⁴⁾ Fungi are also important source of vitamins. They are full of vitamins from group B in particular thiamine, riboflavin, pyridoxine, pantothenic acid, nicotinic acid, nicotinamide, folic acid and cobalamin and other vitamins like ergosterol, biotin and fithonin to-copherol.⁽⁶⁾ Comparing the genera of edible fungi and their content of vitamins showed that *B. edulis* (Bull.: Fr) has the highest amount of vitamin B group, and *L. edodes* (Berk.) Sing has the lowest. *P. ostreatus* (Jacq.: Fr) Kummer contains more folic acid, vitamin B₁ and B₃ compared with *A. bisporus* (Lge.) Sing and *L. edodes* (Berk.) Sing, but less vitamin B₁₂.⁽⁶⁾ The highest amount of vitamin D is found in *L. edodes* (Berk.) Sing and *B. edulis* (Bull.: Fr), and sufficient amounts of pantothenic acid also can be found in these genera of fungi. In 100g fresh mushrooms of *A. bisporus* (Lge.) Sing can be found around 5g of pantothenic acid, a quantity that can be found in any other kind of food. Fungi generally contain low amounts of vitamin C, and quantity usually reach up to 7 mg 100g⁻¹.⁽⁶⁾ From the elaborated data in literature for different genera of fungi as most nutritional genus can be separated genus *Pleurotus* which abounds with trace elements and nutrients, followed genus *Boletus*, *Agaricus*, *Morchella*, *Lactarius* and the least nutrient is the genus *Lentinus*. Seen individually as most nutritional kind of each genus can be separated the following fungi:

- From genus *Pleurotus* - *Pleurotus ostreatus* (Jack.:Fr) or oyster
- From genus *Agaricus* - *Agaricus bisporus* (Lge.)Sing or Champignon
- From genus *Boletus* - *Boletus edulis* (Bull Fr.): or Pennybun
- From genus *Morchella* - *Morchella deliciosa* (L.)Pers. Cup fungi
- From genus *Lactarius* - *Lactarius deliciosus* (L.: Fr) Saffron milk cap
- From genus *Lentinus* - *Lentinus edodes* (Brk) Sing or Shiitake

With such chemical composition the usage of fungi in the diet is more than justified.

REFERENCES

1. Karadelev, M.: *Fungi Macedonici - Fungi of Macedonia*. MMD. Skopje 2002nd pp 37th
2. B. Bauer Petrovska, *Qualitative quantitative study of chemical composition, nutritional and biological value of edible fungi from Macedonia with a special emphasis on nitrogen compounds* Faculty of Pharmacy, Skopje, 2000, PhD thesis, pp 5-8
3. Patrícia L. C. Moura, Vera A. Maihara, Lilian P. de Castro and Rubens C. L. Figueira, 'Essential trace elements in edible mushrooms by neutron activation analysis', *INAC 2007, Santos, SP, Brazil*.
4. E. Bernas, G. Jaworska, S. Lisiewska, 'Edible mushrooms as a source of a valuable nutritive constituents'. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 5(1) 2006, 5 - 20.
5. Janos Vetter 'Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*' *Food Chemistry* 102 (2007) 6 - 9
6. P. Mattila, K. Kõnkö, M. Eurola, J. Pihlava, J. Astola, L. Vahterisco, V. Hietaniemi, J. Kumpulainen, V. Piironen, 'Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms', *J. Agric. Food Chem.*, v.49, pp.2343-2348 (2001).

ОПРАВДАНОСТ НА УПОТРЕБА НА ГАБИ ВО ИСХРАНАТА

Милева Елена, Анита Стефаноска,
Билјана Бауер Петровска

Фармацевтски факултет, Универзитет Св Кирил и Методиј, Скопје

Бројот на регистрирани габи во Република Македонија изнесува околу 1500 вида и тоа 1300 припаѓаат на типовите Basidiomycota додека 200 на типовите Ascomycota, а се претпоставува дека има околу 10000 видови. Претставници кои можат да се јадат се околу 500 но најпознати од нив се: *Amanita caesarea* (Scop.) Pers. (булка), *Agaricus bisporus* (Lge.)Sing. (шампињони), *Macrolepiota procera* (Scop. : Fr.) Sing. (сончарка), *Boletus edulis* Bull (обичен вргањ), *Lactarius deliciosus* (L. ex Fr.) S.F.Gray s (портокалова млечка), *Cantharellus cibarius* Fr. (лисичарка) и други.⁽¹⁾ Регистрирани хуманотоксични габи се околу 100 од кои 20 се смртно отровни како што се *Amanita muscaria* (L.:Fr.) Lam. (мувоморка), *A. pantherina* (DC. ex Fr.) Krombh. (пантерка), *A. phalloides* (Vaill. ex Fr.) Link (зелена пупавка), *A. verna* (Bull.: Fr.) Lam. (бела мувоморка) и многу други.⁽¹⁾ Габите се корисни и вкусни членови на биосферата. Денес, тие се сметаат како алтернативен извор на храна за добивање на адекватна нутриција. Со нивно конзумирање доаѓа до намалување на серумскиот холестерол и до 40% за време од четири недели. Дивите и култивираниите габи се сметаат за добар извор на протеини, а нивото на протеини варира во зависност од генетската структура на габата и хемискиот состав на локацијата каде растат. Генерално култивираниите габи имаат поголеми количини на протеини во себе за разлика од дивите видови. Покрај протеините габите изобилуваат и со шеќери, додека мастите се на ниско ниво со што нутриционата вредност на габите расте.⁽²⁾ Содржината на олигоелементите варира во зависност од видот, локацијата, загаденоста и составот на почвата, делот кој е испитуван и слично, но габите содржат високо ниво на олигоелементи, а присуството на тешки метали, бакар, цинк не треба да се смета за штетно, туку напротив како одличен извор на истите.⁽³⁾ Не треба да се забораваат и есенцијалните аминокиселини кои исто така се присутни во задоволителни количини.⁽⁴⁾ Во овој труд подетално се разработени литературните податоци за шест родови на габи, и тоа: род *Agaricus* (шампињон), род *Boletus* (вргањ), род *Lactarius* (млечка), род *Morchella* (смрча), род *Pleurotus* (буковка), род *Lentinus* (шитаке). Од извршените испитувања за минералниот состав на испитуваните родови може да се забележи дека најбогат род со олигоелементи, и одлична калиум/натриум пропорција е родот *Boletus*.⁽³⁾ Овој род се карактеризира со високи акумулациони способности, па видовите кои растат во позагадена средина содржат поголемо количество на тешки метали. Покрај *Boletus*, и родот *Pleurotus* содржи високи количини на олигоелементи.⁽³⁾ За родот *Agaricus* е карактеристично што при неговото конзервирање се губат значителни количества на калиум и цинк па затоа е препорачливо да се конзумираат свежите видови.⁽³⁾ Родовите *Lentinus* и *Morchella* содржат пониско ниво на олигоелементи.⁽³⁾ На содржината на олигоелементите влијаат и акумулационите способности на габите, па затоа и кај родот *Boletus* е забележана најголема количина на истите.⁽³⁾ Габите покрај олигоелементи содржат и значително количество на хранливи материи. Родот *Pleurotus* содржи највисоко ниво на хранливи материи, а по него следи родот *Agaricus*.⁽⁴⁾ Со најниска хранлива вредност се родовите *Lactarius* и *Lentinus*.⁽⁴⁾ Свежите видови на родот *Agaricus* се побогати со протеини отколку конзервираните и култивираниите.

Исто така и нивната енергетска вредност е помала поради пониската содржина на масти. За разлика од родот *Agaricus*, кај родовите *Boletus* и *Pleurotus* култивираниите видови се значително похранливи од дивите видови.⁽⁵⁾ Покрај тоа што треба да се внимава на тоа дали габите се култивирани или не, важна е и улогата на староста на габата.⁽⁵⁾ Така кај родовите *Lactarius* и *Lentinus* треба да се преферираат младите видови за разлика од родот *Pleurotus* каде похранливи се старите видови на габи. Карактеристично е тоа што родот *Lentinus* содржи највисока вредност за мастите со што има и највисока енергетска вредност за разлика од другите прикажани видови.⁽⁴⁾ Габите се важен извор и на витамини. Тие изобилуваат со витамини од групата Б особено тиамин, рибофлавин, пиридоксин, пантотенска киселина, никотинска киселина, никотинамид, фолна киселина и кобаламин, и витамини од другите групи како ергостерол, биотин, фитохинон и токоферол.⁽⁶⁾ Споредбата помеѓу најпознатите видови на јадливи габи и нивната содржина на витамини покажала дека *B. edulis* (Bull.:Fr) има највисока количина на витамини од Б групата, а *L. edodes* (Berk.) Sing има најниска. *P. ostreatus* (Jacq.:Fr) Kummer содржи поголема количина на фолна киселина, витамин Б₁ и Б₃ во споредба со *A. bisporus* (Lge.) Sing и *L. edodes* (Berk.) Sing, но помалку витамин Б₁₂.⁽⁶⁾ Најголема количина на витамин Д има во *L. edodes* (Berk.) Sing и *B. edulis* (Bull.:Fr). Задоволителна количина на пантотенска киселина може да се најде во овие видови на габи. Во 100g свежа габа од *A. bisporus* (Lge.) Sing може да се најде околу 5g на пантотенска киселина, што е количина која не може да се најде во било кој друг вид на храна. Генерално габите содржат ниска количина на витамин Ц, и количините обично достигнуваат до 7 mg 100g⁻¹.⁽⁶⁾

Од разработените литературни податоци за различни родови на габи како најхранлив род може да се издвои родот *Pleurotus* кој изобилува со олигоелементи и хранливи материји, потоа следат родот *Boletus*, *Agaricus*, *Morchella*, *Lactarius* и како најмалку хранлив родот *Lentinus*. Гледано поединечно како најхранлив вид од секој род може да се издвојат следниве габи:

Од родот *Pleurotus* – *Pleurotus ostreatus* (Jack.:Fr) или буква

Од родот *Agaricus* - *Agaricus bisporus* (Lge.) Sing или шампињон

Од родот *Boletus* – *Boletus edulis* (Bull Fr.:) или летен вргањ

Од родот *Morchella* - *Morchella deliciosa* (L.)Pers. или бела смрча,

Од родот *Lactarius* - *Lactarius deliciosus* (L.:Fr) Gray или рјуница

Од родот *Lentinus* – *Lentinus edodes* (Brk) Sing или шитаке

Со ваков хемиски состав употребата на габите во исхраната е повеќе од оправдана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Караделев, М.: *Fungi Macedonici – Габите на Македонија*. ММД. Скопје; 2002. pp 37.
2. Б. Бауер Петровска, *Квалитативно квантитативно проучување на хемискиот состав, хранливата и биолошката вредност на јадливите габи од Република Македонија со посебен осврт врз азотните соединенија* Фармацевтски факултет, Скопје, 2000, Докторска теза, pp 5-8
3. Patrícia L. C. Moura, Vera A. Maihara, Lilian P. de Castro and Rubens C. L. Figueira, 'Essential trace elements in edible mushrooms by neutron activation analysis', *INAC 2007, Santos, SP, Brazil*.
4. E. Bernas, G. Jaworska, S. Lisiewska, 'Edible mushrooms as a source of a valuable nutritive constituents'. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 5(1) 2006, 5 – 20.
5. Janos Vetter 'Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*' *Food Chemistry* 102 (2007) 6 – 9
6. P. Mattila, K. Kõnkö, M. Euro, J. Pihlava, J. Astola, L. Vahterisalo, V. Hietaniemi, J. Kumpulainen, V. Piironen, 'Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms', *J. Agric. Food Chem.*, v.49, pp.2343-2348 (2001).

BIOCHEMICAL COMPOSITION OF THE BEVERAGE PRODUCED BY JAPANESE CRYSTALS

Biljana Bauer Petrovska¹, Svetlana Cekovska²,
Ljiljana Ugrinova¹, Biljana Chuleva³,
Gordana Jankoska²

¹Faculty of Pharmacy,

²Medical faculty, University St. Cyril and Methodius,

³Institute of Public Health, Skopje, Republic of Macedonia

Refreshing and healthful beverage, was obtained by cultivation of Japanese crystals in a sweet aqueous solution in the presence of raisins. Japanese crystals still popularly are so-called as crystals from the Caucasus, crystals of kefir, water kefir fungus, sea algae, translated into different languages (1). Japanese crystals are not the only organism, but symbiotic community of different species of bacteria and yeast, with many diverse and complex metabolic pathways. The composition of symbionts of these and similar fermentative beverages varies depending on climatic and geographical conditions, which contributes beverage does not always to have the same chemical composition and taste (2-4). Fermentative and oxidative processes begin immediately when the Japanese crystals are transferred into a freshly prepared aqueous solution of sugar in the presence of raisins. Japanese crystals grown in sugar medium as a small biochemical factory produce many other medicinal substances that contribute to beverage to have an unusual taste, aroma and medicinal properties. Because of the diversity of factors affecting the fermentative and oxidative processes, the purpose of this study is to examine and compare the chemical composition of several different prepared beverages for discovering the most effective from them.

MICROBIOLOGICAL RESEARCH

Japanese crystals were placed on Columbia, Schaedler and Calb agar (Oxoid, UK) directly and after 24 hours incubation in de Man Rogosa and Sharpe broth (MRS broth). The plates were incubated under aerobic and anaerobic conditions in 72 hours. The growth of microorganisms was first examined by microscopic and cultural characteristics. Identification of organisms was done by classical biochemical and automated methods. Vitek system (GP, ANC and YST card) was used to identify various microorganisms (5, 6).

MATERIAL AND METHODS

Several beverages obtained by cultivation of Japanese crystals in aqueous solution of varying quantities of sugar and raisins were prepared for this research as follows:

Beverage 1: 3 tablespoons (approximately 40 g) Japanese crystals were spilled over with 1000 ml 2.8% sugar aqueous solution and 6 grains raisins were added.

Beverage 2: 3 tablespoons (approximately 40 g) Japanese crystals were spilled over with 500 ml 5.6% sugar aqueous solution and 6 grains raisins were added.

Beverage 3: 6 tablespoons (approximately 80 g) Japanese crystals were spilled over with 1000 ml 5.6% sugar aqueous solution and 6 grains raisins were added.

At the same time were examined 2.8% and 5.6% sugar aqueous solutions that were used as a medium for cultivation of Japanese crystals in the analyzed beverages. After 24 hours, in the filtered

beverages biochemical composition was investigated by determining the concentration of present sugars, hydro soluble vitamins, urea and iron. Analyses were made with contemporary analytical methods that were used in analytics of food for testing of beverages and fermentative products and in biochemistry for testing of biological fluids (7,8,9).

RESULTS AND DISCUSSION

Gram positive bacilli and yeast structures predominated in microscopic smear. In symbiotic community of analyzed Japanese crystals the following microorganisms *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus spp.*, *Pantoea agglomerans*, *Candida pelliculosa*, *Candida spp* (not *C. albicans*), and *Saccharomyces cerevisiae* were identified. Changes in the chemical composition of the obtained beverages from Japanese crystals were determined during their preparation in the geographical climate conditions in Republic of Macedonia. To demonstrate the advantages of the production of Japanese crystals at the same time were examined and sugar aqueous solutions with raisins, which were used as a medium for cultivation of Japanese crystals in the beverages. Fermentative and oxidative processes begin immediately when the Japanese crystals are transferred into sugar aqueous solution with raisins. Enzymes of Japanese crystals hydrolyzed saccharose into glucose and fructose. For this purpose an analysis was performed for determination of sugars content of saccharose, glucose and fructose by HPLC method with Refractive index detector. After 24 hours fermentation at room temperature was spent 39-67% of saccharose, depending on the used amount of sugar and Japanese crystals (Table 1).

Table 1 Analysis of sugars (%)

	saccharose	fructose	glucose
beverage 1	0,94	0,51	0,42
beverage 2	3,78	0,55	/
beverage 3	2,97	0,62	/
medium 1	2,85	0,09	0,08
medium 2 & 3	6,24	0,16	/

The loss of glucose in beverage 2 and 3 was complete. The same was noted in our previous investigations in Kombucha beverage where also glucose was completely consumed and fructose remained during the fermentative processes (10).

Table 2 Analysis of hydro soluble vitamins (mg / L)

	nicotine amide	vitamin B ₁	vitamin B ₂	pantotenic acid
beverage 1	/	/	/	/
beverage 2	1,30	0,50	0,075	1,90
beverage 3	0,60	0,10		0,94

Hydro soluble vitamins were identified in the beverages and determined by HPLC method of ion pairs. Four hydro soluble vitamins were determined in precisely defined concentrations shown in Table 2. From the obtained values can be concluded that the best biochemical quality, smell, taste and content of the active ingredients has beverage 2 derived from Japanese crystals. The procedure for the preparation of this beverage should be exercised in the future. The recommended daily intake of 1 liter of the beverage 2 obtained

from Japanese crystals significantly will be improved the vitamin status of the human organism.

With biochemical analyses double increase of the concentration of iron and urea was founded in the beverage prepared from Japanese crystals.

REFERENCES

- Available at: <http://www.svetbiljaka.com>
- J. Reiss, Die Teepilz und seine Stoffwechselprodukte, Minhen, (1989).
 - T. Loretana, J.F. Mosterta, B.C. Viljoen, *S. Afr. Jnl. Sci.*, 99(1/2) (2003).
 - C. W. Lin, H. L. Chen, J. R. Liu, *Australian Journal of Dairy Technology*, 54 (1), 14-18 (1999)
 - A. Irigoien, I. Arana, M. Castiella, P. Torre, F.C. Ibáñez, *Food Chem.*, 90(4): 613-620 (2005)
 - L. Garrote, Graciela, et. al. *Jnl. of Dairy Res.*, 68(4):639-652 (2001)
 - B. Chuleva, Determination of hydro soluble vitamins in multivitamins preparations with the aid of HPLC technique, Specialistic thesis, 1999
 - A. Vassault, et al. *Ann. Biol. Clin.*, 44, 686, (1986)
 - N.W. Tietz, *Fundamentals of Clinical Chemistry*, 3rd. Edition (1987), 676-679, W.B. Saunders Company Philadelphia
 - B. Bauer Petrovska, L. Petrushevska Tozi, *Bulletin*, 42 (1/2): 21-25 (1996-1997)

БИОХЕМИСКИ СОСТАВ НА НАПИТОК ДОБИЕН ОД ЈАПОНСКИ КРИСТАЛИ

Билјана Бауер Петровска¹, Светлана Цековска²,
Лилјана Угринова¹, Билјана Чулева³, Гордана
Јанкоска²

¹Фармацевтски факултет,

²Медицински факултет, Универзитет Св Кирил и Методиј,

³Институт за јавно здравје, Скопје, Република Македонија

Освежителен и лековит напиток, се добива со култивација на јапонски кристали во благ воден раствор и присуство на суво грозје. Јапонските кристали уште популарно се нарекуваат и кристали од Кавказ, кристали на кефир, габи за воден кефир, морски алги, преведено на различни јазици (1). Јапонските кристали не се единствен организам, туку симбиотска заедница од повеќе различни бактерии и квасни видови, со многу различни и комплексни метаболични патишта. Составот на симбионтите на вакви и слични ферментативни напитки варира во зависност од климатските и географските услови, што придонесува напитокот не секогаш да има ист хемиски состав и вкус (2-4). Ферментативните и оксидативните процеси започнуваат веднаш кога јапонските кристали се пренесуваат во свежо подготвен воден раствор на шеќер во присуство на суво грозје. Јапонските кристали, одгледувани во шеќерен медиум како мала биохемиска фабрика, продуцираат многу други материи, кои придонесуваат напитокот да има необичен вкус, арома и лековити особини. Поради разновидноста на факторите кои влијаат врз ферментативните и оксидативните процеси, целта на ова истражување беше да се испита и спореди хемискиот состав на неколку начини различно приготвени напитки, за да се изнајде најфикасниот напиток.

МИКРОБИОЛОШКО ИСТРАЖУВАЊЕ

Јапонските кристали беа ставени директно на Columbia, Schaedler и Calb агар (Oxoid, UK) и по 24 часовна инкубација плочите беа инкубирани под аеробни и анаеробни услови во тек на 72 часа. Работот на микроорганизмите првин беше утврден со микроскопски и културелни карактеристики. Идентификацијата на микроорганизми-

те беше направена со класични биохемиски и автоматизирани методи. Vitek систем беше користен за идентификација на различните микроорганизми (5, 6).

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Неколку напитки добиени со култивација на јапонски кристали во воден раствор на различна количина на шеќер и суво грозје беа приготвени за ова истражување, на следните начини: *напиток 1*: 3 лажици (околу 40 г) јапонски кристали се прелеваат со 1000 мл 2,8 % шеќерно воден раствор и се додаваат 6 зрна суво грозје. *напиток 2*: 3 лажици (околу 40 г) јапонски кристали се прелеваат со 500 мл 5,6 % шеќерно воден раствор и се додаваат 6 зрна суво грозје. *напиток 3*: 6 лажици (околу 80 г) јапонски кристали се прелеваат со 1000 мл 5,6 % шеќерно воден раствор и се додаваат 6 зрна суво грозје. Во исто време беа испитувани и 2,8 % и 5,6 % шеќерно водените раствори, кои беа употребувани како медиум за култивација на јапонските кристали во анализираниите напитки. По 24 часа, во про-цедените напитки биохемискиот состав беше испитуван преку одредување на концентрација на присутни шеќери, хидросолубилни витамини, уреа и железо. Анализите беа направени со современи аналитички методи кои се користат во аналитиката на животните прехранбени производи за испитување на пијалаци и ферментативни производи и во биохемијата за испитување на биолошки течности (7,8,9).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Во микроскопскиот размаз преобладаваат позитивни бацили и квасни структури. Во симбиотската заедница на анализираниите јапонски кристали идентификувани беа следните микроорганизми *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus spp.*, *Pantoea agglomerans*, *Candida pelliculosa*, *Candida spp* (не *C. albicans*), и *Saccharomyces cerevisiae*. Промените во хемискиот состав на напитокот добиен од јапонски кристали беа одредувани за време на неговата подготовка во географско климатски услови на Република Македонија. За да се докажат предностите од продукцијата на јапонските кристали во исто време беа испитувани и шеќерно водените раствори со суво грозје, кои беа употребувани како медиум за култивација на јапонските кристали во напитоките. Ферментативните и оксидативните процеси започнуваат веднаш кога јапонските кристали се пренесуваат во шеќерно воден раствор со суво грозје. Ензимите на јапонските кристали ја хидролизираат сахарозата на глукоза и фруктоза. За таа цел беше извршена анализа на шеќери преку определување на содржината на сахароза, глукоза и фруктоза со HPLC метода, со примена на Ri (Refractive index детектор). По 24 часовна ферментација на собна температура беа потрошени од 39-67 % од сахарозата, во зависност од употребената количина на јапонски кристали и шеќер (Табела 1).

	сахароза	фруктоза	глукоза
напиток 1	0,94	0,51	0,42
напиток 2	3,78	0,55	/
напиток 3	2,97	0,62	/
медум 1	2,85	0,09	0,08
медум 2 и 3	6,24	0,16	/

Табела 1 Анализа на шеќери (%)

Загубата на глукоза во напитокот 2 и 3 беше целосна, што беше забележано и во предходните наши истражувања во Комбуха напитокот каде истотака глукозата беше целосно потрошена а

фруктозата остануваше во текот на ферментативните процеси (10). Хидросолубилните витамини во напитоките беа идентификувани и определени со HPLC метода, метод на јонски парови. Четири хидросолубилни витамини беа одредени во точно определени концентрации прикажани на Табела 2.

	НИКОТИН АМИД	ВИТАМИН B ₁	ВИТАМ. B ₂	ПАРИТОТЕНСКА КИСЕЛИНА ВИТАМИН B ₃
напиток 1	/	/	/	/
напиток 2	1,30	0,50	0,075	1,90
напиток 3	0,60	0,10		0,94

Табела 2 Анализа на хидросолубилни витамини (мг/л)

Од добиените вредности може да се заклучи дека најдобар биохемиски квалитет, мирис, вкус и содржина на активни компоненти има напитокот 2 добиен од јапонски кристали. Постапката за приготвување на овој напиток треба да се практикува во иднина. Со препорачаното внесување на 1 литар од овој напиток 2 добиен од јапонски кристали во текот на денот, значително ќе се подобри витаминскиот статус на човековиот организам. Со биохемиските анализи утврдено е двојно зголемување на концентрацијата на железо и уреа кај напитокот добиен од јапонски кристали во однос на медиумот.

ЛИТЕРАТУРА

- Available at: <http://www.svetbiljaka.com>
- J. Reiss, Die Teepilz und seine Stoffwechselprodukte, Minhen, (1989).
 - T. Loretana, J.F. Mosterta, B.C. Viljoen, S. Afr. Jnl. Sci., 99(1/2) (2003).
 - C. W. Lin, H. L. Chen, J. R. Liu, Australian Journal of Dairy Technology, 54 (1), 14-18 (1999)
 - A. Irigoyen, I. Arana, M. Castiella, P. Torre, F.C. Ibáñez, Food Chem., 90(4): 613-620 (2005)
 - L. Garrote, Graciela, et. al. Jnl. of Dairy Res., 68(4):639-652 (2001)
 - B. Chuleva, Determination of hydro soluble vitamins in multivitamins preparations with the aid of HPLC technique, Specialistic thesis, 1999
 - A. Vassault, et al. Ann. Biol. Clin., 44, 686, (1986)
 - N.W. Tietz, Fundamentals of Clinical Chemistry, 3rd. Edition (1987), 676-679, W.B. Saunders Company Philadelphia
 - B. Bauer Petrovska, L. Petrushevska Tozi, Bulletin, 42 (1/2): 21-25 (1996-1997)

LEVELS OF SOME TRACE ELEMENTS IN SOME MACEDONIAN THYMUS SPP.

Biljana Bauer Petrovska¹, Olga Kirovska Cigulevska²

¹Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, P.O. Box 36, 1000 Skopje, Macedonia

²JZO IHP, Third Mac. Brigade, P. Box 809, 1000 Skopje, Macedonia

Thyme is an aromatic plant that has long time ago been used in traditional medicine and as a culinary spice. Overhead part as an officinal drug (DAB 10, BHP 1996, Ph. Helv. VII, etc.) comes within certain phytopreparations because of its expectorant, antiseptic and spasmolytic action. The effects from the accumulation of metals are very complex and can influence the content of pharmacologically active compounds in plants. Thus significantly changes the quality, safety and efficiency of their natural plant products (1). Because of nutritional, pharmacological and toxicological point of view we decided for this research.

MATERIAL AND METHODS

Elevated parts of thyme were collected during the spring period of 2011 from various localities in the Republic of Macedonia: sredno Vodno, Markov manastir, Markova Susica, villages Gorno Sonje and Orman. Samples were dried at room temperature and homogenised.

After the mineralization with concentrated HNO₃ (trace pure, 69%) and H₂O₂ (extra pure, 30%), samples were dissolved in 2% HNO₃. The quantity of trace elements is determined by the method of atomic emission apparatus ICP-QES.

RESULTS AND DISCUSSION

Results expressed on dry matter basis (Table 1) indicate that not all tested trace elements: lead, cadmium, chromium, copper and zinc are found in the analyzed samples of thyme, collected from various localities in Macedonia.

	Pb	Cd	Cu	Cr	Zn
sredno Vodno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Markov manastir	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Markova Susica	n.i.	n.i.	1,800	n.i.	n.i.
v. Gorno Sonje	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
v. Orman	n.i.	n.i.	1,600	0,055	0,013
n.i. not identified					

Table 1 Concentration of some trace elements (mg/kg dry mass) in the Thymus spp.

Amounts of copper found in almost trace quantities in the samples from Markova Susica and village Orman suggest that probably the plant protection means are used with copper, which otherwise are not regularly found in soil here. According to the values for copper in thyme compared with those of (15.15-24.64 mg/kg) other medicinal plants (i.e. chamomile, lime, lemon balm, mint and St. John's wort) from literature data (3) can be concluded that thyme is not a copper bio accumulator, probably due to under-developed root system.

Chromium was only present in the sample of thyme from the village Orman. The content is very low and insufficient to meet the recommended daily dose of biologically active chromium (50-200 mg) that in the body binding to insulin increases its activity up to 100 times (2). In the sample from the village Orman found content of zinc was in very low concentrations, insufficient to meet the daily requirements for zinc in humans.

Permissible limit recommended by WHO for the content of cadmium and lead in medicinal plants is 0,3 mg / kg (Cd) and 10 mg / kg (Pb) expressed on a dry plant matter. Under current legislation in the Republic of Macedonia (4) there is a restriction on the maximum allowable concentration for lead to 0.1 mg/kg and for cadmium to 0.2 mg/kg expressed on fresh herbs.

CONCLUSION

One glass infusion from the sample of thyme from the village Orman (250 cm³) contains elements in quantities corresponding to: 0.001 % of the recommended average daily intake of zinc, 0.888 % of the rec-

ommended average daily intake of copper and 0.550 % of the recommended average daily intake of chromium.

From the obtained results for the discovered concentrations of lead and cadmium in aboveground parts of thyme can be concluded that all analyzed regions in Republic of Macedonia has pure soil and unpolluted environment, so the thyme from Republic of Macedonia is safe to use.

REFERENCES

1. R. Kastoru, Heavy Metals in the Environment, Naucni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 1997, pp 197-257.
2. S. Tojagic, M. Mirilov, Hrana-znacaj i tokovi u organizmu, Matica srpska, Novi Sad, 1998,
3. J. Raczuk, E. Biardzka, J. Daruk, Rocznik Panstw Zakl Hig. 59(1), 33-40 (2008)
4. Pravilnik za opшти baranja za bezbednost na hrana, Sl. Vesnik RM 118/05.

СОДРЖИНА НА МЕТАЛИ ВО THYMUS SPP. ОД РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

Билјана Бауер Петровска¹,
Олга Кировска Цигулевска²

¹Фармацевтски факултет, Водњанска 17, П. Фах 36,

²ЈЗО 333, Трета Мак. Бригада, П. Фах 809, 1000 Скопје, Република Македонија

Мајчина душица е ароматично растение кое одамна се употребува во традиционалната медицина а и како зачин во кулинарството. Надземниот дел како официјелна дрога (DAB 10, ВНР 1996, Ph. Helv. VII и др.) влегува во состав на одредени фитопрепарати поради нејзиното експекторантно, антисептично и спазмолитично дејство. Ефектите од акумулацијата на металите се многу комплексни и можат да влијаат на содржината на фармаколошки активните соединенија во растенијата, а со тоа и на значајни промени на квалитетот, безбедноста и ефикасноста на нивните природни растителни препарати (1). Поради тоа од нутритивен, фармаколошки и токсиколошки аспект се одлучивме за ова истражување.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Надземните делови од мајчина душица беа собрани во пролетниот период во текот на 2011 година од разни локалитети во Република Македонија: средно Водно, Марков манастир, Маркова сушица, с. Горно Соње и с. Орман. Примероците беа осушени на собна температура и хомогенизирани.

По извршената минерализација со концентрирана HNO₃ (trace pure, 69 %) и H₂O₂ (extra pure, 30%), примероците беа растворени во 2% HNO₃. Количеството на метали е определувано со метод на атомска емисија на апарат ICP-QES.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Резултатите изразени на сува материја (Табела 1) укажуваат на тоа дека не сите испитувани метали: олово, кадмиум, хром, бакар и цинк се најдени во анализираните примероци на мајчина душица собрани од разни локалитети во Република Македонија.

	Pb	Cd	Cu	Cr	Zn
средно Водно	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
Марков манастир	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
Маркова сушица	н.и.	н.и.	1,800	н.и.	н.и.
с. Горно Соње	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
с. Орман	н.и.	н.и.	1,600	0,055	0,013

н.и. не е идентификувано

Табела 1. Концентрација на некои метали (mg/kg сува материја) во *Thymus spp.*

Количините на бакар кои се пронајдени речиси во трагови во примероците од Маркова сушица и село Орман укажуваат на фактот дека веројатно за заштита на растенијата се користени средства со бакар, кој инаку редовно не се наоѓа во почвата кај нас. Според добиените вредности за бакар во мајчината душица споредени со оние (15,15-24,64 mg/kg) на други лековити растенија (камилица, липа, маточина, нане, кантарион) од литературните податоци (3) може да се заклучи дека мајчината душица не е биоаккумулятор на бакар, најверојатно поради недоволно развиениот коренов систем. Хромот беше присутен само во примерокот на мајчина душица од село Орман. Содржината е многу ниска и недоволна за задоволување на препорачаната дневна доза на биолошки активен хром (50-200 mg) кој во организмот врзувајќи се за инсулин ја зголемува неговата активност и до 100 пати (2).

Во примерокот од село Орман најдената содржина на цинк беше во многу ниски концентрации, недоволни за задоволување на дневните потреби за цинк на човекот.

Препорачана дозволена граница според СЗО за содржина на кадмиум и олово во лековити растенија изнесува 0,3 mg/kg (Cd) и 10 mg/kg (Pb) изразени на сува растителна материја. Според актуелната законска регулатива во Република Македонија (4) постои ограничување на максимално дозволена концентрација за олово до 0,1 mg/kg и за кадмиум до 0,2 mg/kg изразени на свежи билки.

ЗАКЛУЧОК

Една чаша инфуз од примерокот на мајчина душица од село Орман (250 cm³) содржи елементи во количини соодветни на 0,001% од препорачан просечен дневен внес на цинк, 0,888% од препорачан просечен дневен внес на бакар и 0,550% од препорачан просечен дневен внес на хром.

Од добиените резултати за најдените концентрации за олово и кадмиум во надземни делови на мајчина душица може да се констатира дека во сите анализирани региони во Република Македонија има чиста почва и воопшто незагадена околина, па затоа мајчината душица од Република Македонија е безбедна за употреба.

ЛИТЕРАТУРА

1. R. Kastoru, Heavy Metals in the Environment, Naucni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 1997, pp 197-257.
2. S. Tojagic, M. Mirilov, Hrana-znacaj i tokovi u organizmu, Matica srpska, Novi Sad, 1998,
3. J. Raczuk, E. Biardzka, *J. Daruk, Rocz Panstw Zakl Hig.* 59(1), 33-40 (2008)

4. Pravilnik za opшти baranja za bezbednost na hrana, Sl. Vesnik RM 118/05.

PROTECTIVE ROLE OF SALIVARIC UREA IN CARIOGENIC PROCESSES

D. Efremova¹, M. Spasovska², S. Neshova³,
T. Kadifkova Panovska⁴

¹DOOEL „ReplekFarm“, Skopje;

²P.Z.U. Pharmacy „Prima“, Ohrid;

³P.Z.U. Pharmacy „Naris“, Veles;

⁴Faculty of Pharmacy, Skopje

Saliva is a biological environment necessary for the physiology of the mouth. It is in dynamic balance with oral tissues and plays a role in preserving the integrity of the soft as well as the hard tissues. There are protective role and is an integral part of the general protective funds of the body. The main function of saliva is to maintain physiological balance in the mouth and enamel-mucosal barrier. This function is accomplished by dissolving effect, buffer effect and antibacterial protective role of saliva.

Many authors give a big and even a major role of saliva in cariogenic tooth decay. Caries is initiated (started) under the dental plaque from acidic organisms (destructive lactobacilli) in the presence of fermentable carbohydrates. Critical pH in the oral cavity is 5.1. Above this pH, dental plaque contains more calcium and phosphorus, from saliva. When you expose your teeth to carbohydrates, the pH in the mouth may fall to 4.0 or less for several minutes. This causes demineralization of dental tissue (cavities), or dissolution of minerals from the teeth, which demineralization increases as pH decreases the oral environment. Therefore, especially important role of saliva is neutralizing the acids in the oral cavity, its buffer effect. Saliva is neutralizing the demineralization effect of acids on enamel, which indirectly means protecting the integrity of dental tissues. This buffer capacity of saliva is provided by buffer systems which saliva possess. Except bicarbonate, phosphate and protein buffer in maintaining the balance of acid-basic oral environment, participating and other compounds and enzymes, such as urea, amylase and salivary fluorides as prophylactic buffer.

The importance of urea in saliva is known a long time. It has a dual role: it inhibits the metabolism and multiplication of bacteria in the saliva of one hand and on the other hand indirectly affect neutralizing the acids in the oral environment, which participates in maintaining the salivary balance and it actually owes its buffer capacity. Urea is the main source of alkali in the mouth and is delivered in all salivary gland secretions at concentrations ranging from 3 to 10 mmol/L in healthy individuals. Urea entering the mouth is hydrolyzed to carbon dioxide and ammonia by bacterial ureases. Ammonia production from urea metabolism has been identified as a mechanism by which oral bacteria are protected against acid killing; maintain a relatively neutral environmental pH that may suppress the emergence of a cariogenic microflora; and derive bioenergetic advantages, including increasing pH.

Sequence studies have shown that urea increases the pH value of dental plaque up to 9 and the addition of 40-50% urea in carbohydrates products resulting in regulation pH levels of dental plaque. This effect triggered the idea of incorporating the carbamide (synthetic urea crystals) in sweets and other products containing fermentable carbohydrates, in order to reduce their cariogenic effect. Urea can be used as a constituent in chewing gum. The effect of urea in chewing gums without sugar, was investigated in subjects who chewing a gums with different content of urea. There was established that higher concen-

trations of urea in chewing gum resulted in the highest values of pH. Hence chewing gums containing urea can be used for the prevention or slowing the cariogenic process.

Conclusion: Data from the professional scientific literature indicate a significantly positive relation to the buffer capacity of saliva through urea. Urea is increase the pH in the oral cavity and it active protective against the occurrence of cariogenic processes.

REFERENCES

1. Nascimento MM, Gordan VV, Garvan CW, Browngardt CM, Burne RA. Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. *Oral Microbiol Immunol.* 2009 Jun;24(3):264.
2. Jens Kreth, Yongshu Zhang, and Mark C. Herzberg. Streptococcal Antagonism in Oral Biofilms: Streptococcus sanguinis and Streptococcus gordonii Interference with Streptococcus mutans. *J Bacteriol.* 2008 July; 190(13): 4632-4640.
3. Gordan VV, Garvan CW, Ottenga ME, Schulte R, Harris PA, McEdward D, Magnusson I. Could alkali production be considered an approach for caries control? *Caries Res.* 2010;44(6):547-54. Epub 2010 Nov 13.
4. Lazarchik DA, Haywood VB. Use of tray-applied 10 percent carbamide peroxide gels for improving oral health in patients with special-care needs. *J Am Dent Assoc.* 2010 Jun;141(6):639-46.
5. Colin Dawes, BSc, BDS, PhD. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc, Vol 139, No suppl_2, 18S-24S.*
6. Dibdin GH, Dawes C. A mathematical model of the influence of salivary urea on the pH of fasted dental plaque and on the changes occurring during a cariogenic challenge. *Caries Res.* 1998;32(1):70-4.

ЗАШТИТНА УЛОГА НА САЛИВАРНАТА УРЕА ОД КАРИЕС

Д. Ефремова¹, М. Спасовска², С. Нешова³,
Т. Кадићкова-Пановска⁴

¹ДООЕЛ „РеплекФарм“, Скопје;

²П.З.У. Аптека „Прима“, Охрид;

³П.З.У. Аптека „Нарис“, Велес;

⁴Фармацевтски факултет, Скопје

Плунката претставува биолошка средина неопходна за физиологијата на устата. Таа е во динамичка рамнотежа со оралните ткива и има улога во зачувувањето на интегритетот како на меките, така и на тврдите ткива. Има и протективна улога и е составен дел на општите заштитни хуморални средства на организмот. Основната функција на плунката е да ја зачува физиолошката рамнотежа во устата и мукозно-емајловата бариера. Оваа функција се остварува преку растворувачкиот, пуферскиот ефект и заштитната антибактериска улога на плунката.

Многу автори на плунката и даваат голема, па дури и главна улога, во кариогенезата на забите. Кариесот се иницира (започнува) под денталниот плак од ацидогени микроорганизми (деструктивни Лактобацили) кога ќе се изложат на ферментабилни јагленохидрати. Критична рН во усната празнина е 5.1. Над оваа рН вредност, забниот плак содржи повеќе калциум и фосфор, од плунката. Кога забите ќе се изложат на јагленохидрати, рН во устата може да падна и до 4.0 или помалку за неколку минути. Ова предизвикува деминерализација на забното ткиво (кариес), односно растворање на минералите од забите, која деминерализација се зголемува како што се намалува рН на усната средина. Поради тоа, посебно значајна улога на плунката е неутрализирањето на киселините во оралната празнина, односно нејзиниот пуферски ефект. Плунката го неутрализира деминерализирачкиот ефект на киселините врз емајлот, што

индиректно значи заштита на интегритетот на забното ткиво. Оваа пуферска способност на плунката е овозможена од пуферските системи кои ги поседува. Освен бикарбонатниот, фосфатниот и протеинскиот пуфер, во одржувањето на ацидобазната рамнотежа на оралната средина, учествуваат и други соединенија и ензими, како што се уреата, саливарната амилаза и флуоридите како профилактички пуфер.

Важноста на саливарната уреа е позната од поодамна. Таа има двојна улога: го инхибира метаболизмот и размножувањето на бактериите во плунката од една страна, а од друга страна индиректно влијае на неутрализирањето на киселините во оралната средина, со што учествува во одржувањето на саливарната ацидобазна рамнотежа и на тоа всушност се должи нејзиниот пуферски капацитет. Уреата е главниот извор на алкалии во устата и се излучува од сите плункови жлезди во концентрација од 3 до 10 mmol/L кај здрави индивидуи. Кога ќе навлезе во усната празнина, уреата се хидролизира од бактериските уреази до јаглерод диоксид и амонијак. Амонијакот со својата алкалност, учествува во неутрализирањето на киселините, предизвикувајќи на тој начин покачување на рН и до 9. Од друга страна, амонијакот го редуцира бројот на Лактобацилите (кисели бактерии) во плунката преку одржување на неутрална рН во усната празнина. На тој начин се спречува појавата на кариогената микрофлора.

Низа истражувања покажале дека уреата ја покачува вредноста на рН во плакот до 9 и дека додавањето на 40-50% уреа во јагленохидратните производи резултира со регулирање (нормализирање) на нивото на плаковиот рН. Ваквиот ефект ја поттикнал идејата за вклучување на карбамидот (синтетски кристали на уреа) во слатките и другите производи кои содржат ферментабилни јагленохидрати, со цел да се намали нивниот кариоген ефект.

За неутрализирање на интраоралниот ацидитет, уреата може да биде употребена и како конститuent во гумите за цвакање. Ефектот на уреата во гумите за цвакање без шеќер, било испитувано на испитаници кои цвакале гуми со различна содржина на уреа. Било востановено дека повисоките концентрации на уреата во гумите за цвакање резултирале со највисоки вредности на рН. Оттаму гумата за цвакање која содржи уреа може да се користи за превенција или забавување на кариогениот процес.

Заклучок: Податоците од стручно-научната литература укажуваат на сигнификантно позитивен однос на пуферскиот капацитет на плунката преку уреата, со појавата на забниот кариес. Односно зголемувањето на рН во усната празнина делува протективно врз појавата на кариогени процеси.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nascimento MM, Gordan VV, Garvan CW, Browngardt CM, Burne RA. Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. *Oral Microbiol Immunol.* 2009 Jun;24(3):264.
2. Jens Kreth, Yongshu Zhang, and Mark C. Herzberg. Streptococcal Antagonism in Oral Biofilms: Streptococcus sanguinis and Streptococcus gordonii Interference with Streptococcus mutans. *J Bacteriol.* 2008 July; 190(13): 4632-4640.
3. Gordan VV, Garvan CW, Ottenga ME, Schulte R, Harris PA, McEdward D, Magnusson I. Could alkali production be considered an approach for caries control? *Caries Res.* 2010;44(6):547-54. Epub 2010 Nov 13.
4. Lazarchik DA, Haywood VB. Use of tray-applied 10 percent carbamide peroxide gels for improving oral health in patients with special-care needs. *J Am Dent Assoc.* 2010 Jun;141(6):639-46.
5. Colin Dawes, BSc, BDS, PhD. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc, Vol 139, No suppl_2, 18S-24S.*
6. Dibdin GH, Dawes C. A mathematical model of the influence of salivary urea on the pH of fasted dental plaque and on the changes occurring during a cariogenic challenge. *Caries Res.* 1998;32(1):70-4.

CREATIN KINAZA - MB (CK-MB) ISOENZYME, AMI EVALUATION MARKER

S. Neshova¹, M. Spasovska², D. Efremova³,
T. Kadifkova Panovska⁴

¹Naris Pharmacy, Veles,

²Prima Pharmacy, Ohrid,

³Replekfarm Ltd., Skopje,

⁴Faculty of Pharmacy Skopje

Acute myocardial infarction

Acute myocardial infarction (AMI) is a state of ischemic necrosis caused by sudden deprivation of the coronary flow in certain segments of the myocardium.

According to the World Health Organization, the diagnosis of acute myocardial infarction is caused by at least two of the following criteria:

- 1) Anamnesis data of the characteristic chest pain.
- 2) Evolution changes of the electrocardiogram.
- 3) Elevation of the serum cardiac enzymes in series of specimens.

CREATIN KINAZA (CK)

Creatin Kinaza is an enzyme of 82 000-dalton molecular mass, responsible for transfer of the phosphate group from ATP to the creatin. CK is a dimer consisting of two substances (B and M) and it has three isoenzymes formed by various combinations of the both substances (MB, MM, and BB). The BB isoenzyme is mainly situated in the brain and kidneys, and the MM is mainly in skeletal and cardio muscles.

CREATIN KINAZA-MB (CK-MB)

The MB isoenzyme is mainly present in the cardio muscle and in small quantities in the skeletal muscles, and the myocardium is the only tissue from which when damaged CK-MB enters in the serum in substantial quantities. CK-MB by losing lysine residue it turns into two isoforms in the blood stream (subtypes) CK-MB1 and CK-MB2. For many years the serial elevation of CK-MB was "the golden standard" in the laboratory diagnosis of the myocardial infarction, and many studies have shown that the increased levels of CK-MB more than or equal to 6% from the total CK, were an obvious indicator for myocardial damage. During the last several years new methods were developed. These methods use anti CK-MB monoclonal antibodies and less interference, and more analytical sensitiveness in comparison to the tests that measure activity. These mass tests (CK-MB mass) are more employable and more specific than the previous CK-MB tests, since they measure the protein concentration more precisely in comparison to its catalytic activity. CK-MB mass tests are with diagnostic sensitivity of 50% after 3 hours and 80% after 6 hours from the beginning of the infarction.

After a series of examinations it was noticed that the value of CK-MB mass test from the series of blood specimens from the period from 0 to 12 hours after the beginning of the infarction is fast and precise diagnostic approach for categorization of patients with acute myocardial infarction (AMI). This usage of serial serum specimens gives the possibility for more sensitive and specific determination of CK-MB than only one measuring in the diagnosis of AMI. During acute MI the level of CK-MB begins to increase in 3-4 hours, and reaches its peak in 10-24 hours and then it begins to return into normal in 36-72 hours.

This sudden increase and subsequent early fall of the level of CK-MB gives the possibility to be used as a marker for re-infarction of the myocardium but not for its diagnosis in the first several hours. Early diagnosis of AMI (less than 6 hours) is possible when two markers are used like CK-MB and myoglobin.

It is proven that the absolute level of isoform CK-MB2/CK-MB1 more than 1.5 has 59% sensitiveness for diagnosis of AMI in 2-4 hours and 92% sensitiveness in 4-6 hours. Although CK-MB was generally accepted as the best marker for acute myocardial infarction (AMI), the presence of CK-MB in the skeletal muscles can make the diagnosis for AMI more difficult when at the same time there is skeletal muscles damage. Although the specificity comes from the fact that 40% of the activity of CK in the heart muscle is CK-MB, and less than 2% in the skeletal muscles and other organs, therefore, a small increase of CK-MB would be a myocardial damage indicator. In order to increase the specificity of CK-MB towards the heart tissue, it is proposed proportion (relative index) of CK-MB mass / CK activity. If this proportion is above 3, indicatively, it is more possible to be AMI than skeletal muscles damages.

CK-MB has a very important role in the diagnosis of AMI and in case of calculation of re-infarction.

REFERENCES

Ptileo PR, et al. Early diagnosis of acute myocardial infarction based on assay for sub forms of CKMB. Circulation 1990, 82:759-764

Collison PO, Rosalki SB, Kuwana T et al. Early diagnosis of acute myocardial infarction by CK-MB mass measurements Ann Clin Biochem 1992;29:43-47

Rajappa M, Sharma A. Biomarkers of cardiac injury Department of Biochemistry, Maulana Azad Medical College, New Delhi, India.

Mercer DW. Role of cardiac markers in evaluation of suspected myocardial infarction. Selecting the most clinically useful indicators. Postgrad Med 1997;102(5):113-22.

P.K. Nigam Department of Cardiology, King George's Medical University Lucknow Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2007 / 22 (1) 10-17

КРЕАТИН КИНАЗА -МВ (СК-МВ) ИЗОЕНЗИМ, МАРКЕР ЗА ЕВАЛУАЦИЈА НА АМИ

С. Нешова¹, М. Спасовска², Д. Ефремова³,
Т. Кадиџкова Пановска⁴

¹П.З.У.Аптека "Нарис", Велес,

²П.З.У.Аптека "Прима", Охрид,

³ДООЕЛ "РеплекФарм", Скопје,

⁴Фармацевтски факултет, Скопје

Акутен миокарден инфаркт

Акутен миокарден инфаркт (АМИ) преставува состојба на исхемична некроза предизвикана од ненадеен прекин на коронарниот проток во одредени сегменти на миокардот. Според Светска Здравствена Организација, дијагнозата на акутен миокарден инфаркт бара присуство на најмалку два од следниве критериуми:

- 1.) Анамнестички податок за карактеристични болки во градите.
- 2.) Еволутивни промени на електрокардиограмот.
- 3.) Елевација на кардиалните ензими во сериски серумски примероци.

КРЕАТИН КИНАЗА (СК)

Креатин киназа е ензим со молекуларна маса од 82.000 далтони, одговорен за трансфер на фосфатната група од АТР до креатинот. СК е димер составен од две субединици (В и М) и има три изоензими формирани со различни комбинации на двете субединици (МВ, ММ, ВВ). ВВ изоензимот главно се наоѓа во мозокот и бубрезите, додека ММ изоензимот главно се наоѓа во скелетната и срцевата мускулатура.

КРЕАТИН КИНАЗА-МВ (СК-МВ)

МВ изоензимот главно е присутен во срцевиот мускул и во мали количини во скелетната мускулатура, а миокардот е единствено ткиво од кое при оштетување СК-МВ влегува во серумот во значајни количества. Во крвотокот СК-МВ со губење на лизински остаток поминува во две изоформи (субтипови) СК-МВ1 и СК-МВ2. Многу години сериската елевација на СК-МВ била "златен стандард" во лабораториската дијагноза на миокардниот инфаркт а бројни студии укажуваат дека покачените нивоа на СК-МВ поголеми или еднакви на 6% од вкупниот СК, се добар индикатор за миокардното оштетување. Во последниве години се развиле нови методи кои користат анти СК-МВ моноклонални антитела, и кои имаат помала интерференција, а поголема аналитичка сензитивност во однос на тестовите кои мерат активност. Овие масени тестови (СК-МВ маса) се поприменливи и посепцифични отколку претходните СК-МВ тестови, бидејќи попрецизно ја мерат протеинската концентрација на СК-МВ во однос на неговата каталитичка активност. СК-МВ маса тестовите се со дијагностичка сензитивност од 50% после 3 часа и 80% после 6 часа од започнувањето на инфарктот.

По низа испитувања било забележано дека вредноста од СК-МВ маса тестот добиен од серија крвни примероци собирани во период од 0-12 часа после започнување на инфарктот е брз и прецизен дијагностички пристап за категоризација на пациенти со акутен миокарден инфаркт (АМИ). Ваквото користење на сериски серумски примероци дава можност за посензитивно и специфично одредување на СК-МВ отколку само едно мерење во дијагностицирањето на АМИ. При акутен МИ нивото на СК-МВ почнува да се покачува за 3-4 часа, го достигнува својот пик за 10-24 часа и почнува да се враќа во нормала за 36-72 часа. Ова нагло покачување и субсеквентно рано опаѓање на нивото на СК-МВ дава можност да се користи како маркер за реинфаркција на миокард но не и за негово дијагностицирање во првите часови. Раната дијагноза на АМИ (помалку од 6 часа) е возможна кога се користат два маркера како СК-МВ и миоглобинот. Докажано е дека апсолутното ниво на изоформата СК-МВ2 повеќе од 1 U/L или односот од СК-МВ2/СК-МВ1 повеќе од 1,5 има 59% сензитивност за дијагноза на АМИ во 2-4 час и 92% сензитивност во 4-6 час. Иако СК-МВ била генерално прифатена како најдобар маркер за акутен миокарден инфаркт (АМИ), присутноста на СК-МВ и во скелетната мускулатура може да ја отежне дијагнозата за АМИ кога истовремено има и оштетување на скелетната мускулатура. Иако специфичноста потекнува од фактот да 40% од активноста на СК во срцевиот мускул е СК-МВ, а помалку од 2% во скелетните мускули и други органи, па и мал пораст на СК-МВ би бил индикатор за миокардно оштетување. За да се зголеми специфичноста на СК-МВ кон срцевото ткиво, се предлага однос (релативен индекс) на СК-МВ маса / СК активност. Ако овој однос надминува 3, индикативно е дека се работи повеќе за АМИ отколку за повреда на скелетните мускули.

СК-МВ има многу важна улога во дијагноза на АМИ и во случај на проценката на реинфаркт.

ЛИТЕРАТУРА

- Ptileo PR, et al. Early diagnosis of acute myocardial infarction based on assay for sub forms of CKMB. *Circulation* 1990, 82:759-764
Collison PO, Rosalki SB, Kuwana T et al. Early diagnosis of acute myocardial infarction by CK-MB mass measurements *Ann Clin Biochem* 1992;29:43-47
Rajappa M, Sharma A. Biomarkers of cardiac injury Department of Biochemistry, Maulana Azad Medical College, New Delhi, India.
Mercer DW. Role of cardiac markers in evaluation of suspected myocardial infarction. Selecting the most clinically useful indicators. *Postgrad Med* 1997;102(5):113-22.
P.K. Nigam Department of Cardiology, King George's Medical University Lucknow Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2007 / 22 (1) 10-17

THE VALUES OF PARAMETERS OF OXIDATIVE STATUS AS A POSSIBLE FACTOR IN PREDICTING PREMATURE RETINOPATHY

Gorica Banjac¹, Predrag Stojakovic¹, Marija Slavkovic¹, Jasmina Ivanisevic¹, Milica Miljkovic¹, Tamara Gorkovic¹, Jelena Kotur-Stevuljevic¹, Lidija Banjac²

¹Department for Medical Biochemistry, Faculty of Pharmacy- University of Belgrade, Serbia

²Department of Neonatology, Institute for Children's Disease, Clinical Center of Montenegro, Podgorica, Montenegro

INTRODUCTION

Retinopathy of prematurity (ROP) is the most common disease of prematurity and cause of blindness in children. Manifested by the cessation of development of normal retinal blood vessels and proliferation of new blood vessels, that can lead to the destruction of the retina. ROP belongs to the group of free-radical mediated diseases.

OBJECTIVE

The objective was to compare the level of oxidative stress parameters and antioxidant protection between premature infants with retinopathy and without retinopathy. Second aim was to test the theory of the possible correlation between gestational age and birth weight with serum levels of parameters of oxidative stress.

MATERIALS AND METHODS

This study included 59 premature infants with gestational age ≤ 33 weeks. Serum samples were taken in 33rd week postnatally. Total oxidative status (TOS) was determined by spectrophotometric method with o-dianisidine chromogen; total antioxidant status (TAS) with colorimetric assay using a stable ABTS⁺ cations as chromogene, and the concentration of malondialdehyde (MDA) as markers of lipid peroxidation, spectrophotometrically with tiobarbituric acid.

RESULTS

The results of our study showed that in premature infants who developed ROP, compared to infants without ROP, values of MDA and TOS were significantly increased, (MDA: 1.82 (1.38-2.40) mmol/L vs. 1.33 mmol/L (1.16-1.52), $p < 0.05$), TOS (60.57 \pm 48.79 mmol/L vs. 38.62 \pm 31.75 mmol/L, $p < 0.05$). It has been shown a positive correlation between the value of TAS and gestational age and weight at birth ($p = +0.425$, $p < 0.05$; $p = +0.552$, $p < 0.05$).

CONCLUSION

Results suggested that premature infants with ROP are in a state of higher oxidative stress, and that the enzymatic antioxidant protection

is more developed in older premature infants with higher birth weights.

REFERENCES

- [1] Ozcan Erel. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry* 38 (2005) 1103-1111
- [2] Perrone S, Vezzosi P, Longini M, Marzocchi B, Paffetti P, Bellieni CV, Martinelli S, Buonocore G. Biomarkers of oxidative stress in babies at high risk for retinopathy of prematurity. *Front Biosci.* 2009 1:547-52.
- [3] G. Buonocore, S. Perrone. Biomarkers of oxidative stress in the fetus and newborn, *Haematologica reports*, 2006;2(10):103-107

PARAOXONASE-1 (PON-1) STATUS IN THE PREMATURE NEWBORN

Milica Miljkovic¹, Tamara Gojkovic¹, Predrag Stojakovic¹, Gorica Banjac¹, Marija Slavkovic¹, Jasmina Ivanisevic¹, Jelena Kotur-Stevuljevic¹, Lidija Banjac²

¹Department for Medical Biochemistry, Faculty of Pharmacy- University of Belgrade, Serbia

²Department of Neonatology, Institute for Children's Disease, Clinical Center of Montenegro, Podgorica, Montenegro

BACKGROUND

Many illnesses in preterm infants, such as chronic lung disease, are thought to be related to the action of reactive oxygen species (ROS). Antioxidant system, fighting against ROS, is highly stressed and incompletely developed in preterm infants. The enzyme paraoxonase-1 (PON-1), situated at the HDL lipoprotein particles, contributes to their antioxidant defense system. There are numerous polymorphisms of PON-1 gene, which affect the structure and function of PON-1 protein.

OBJECTIVE

The aim of this study was to investigate association of PON1 192 polymorphism- QQ, QR and RR phenotype with the level of oxidative stress and antioxidative capacity as well as PON1 phenotype relation with clinical parameters and most common premature infants' disorders.

MATERIAL AND METHODS

Blood samples were collected from fifty nine premature infants after written consent obtained from their parents. Serum PON1 paraoxonase activity was measured spectrophotometrically at 412 nm using paraoxone as a substrate. Malondialdehyde (MDA) was measured as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) at 535 nm. Results were expressed as mean \pm standard deviation for normally distributed data or as median and 95% confidence interval for non-normally distributed data.

RESULTS

Results showed negative correlation between PON1 activity and MDA ($\rho=-0.292$, $p<0.05$). We have also noticed lower MDA values in RR phenotype subgroup compared to QQ subgroup [1.420 (1.081-1.760) $\mu\text{mol/L}$ vs. 1.930 (1.225-2.788) $\mu\text{mol/L}$, $P=0.184$]. Required mechanical ventilation has lasted longer in RR phenotype infants compared to QQ phenotype, but without significance (15.57 \pm 13.16 hours vs. 7.33 \pm 3.98 hours, $P=0.281$). Also, we did not detect significant interaction between PON1 phenotype and respiratory distress syndrome as one of the most common disorders in premature infants.

CONCLUSION

We found better antioxidative capabilities in newborns with RR PON1 activity phenotype. Negative correlation between lipid peroxidation marker- MDA and PON1 activity suggests free radical involvement in newborns' antioxidative system damage.

REFERENCES

- [1] Mackness B., Mackness MI, Arrol S., Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *Br J Pharmacol* 1997, 112: 265-268
- [2] Toby B. Colea, Rachel L. Jampsa, Betsy J. Walter, Tara L. Arndt, Rebecca J. Richter, Diana M. Shih, Aaron Tward, Ald Lusi, Rhona M. Jacke, Lucio G. Costa and Clement E. Furlong, Expression of human paraoxonase (PON1) during development, *Pharmacogenetics* 2003, 13:357-364

LONGITUDINAL OXIDATIVE STRESS CHANGES IN HEART DISEASE CHILDREN DURING SURGICAL TREATMENT AND ACUTE HEART DISEASE EXACERBATION

Slavkovic Marija¹, Stojakovic Predrag¹, Banjac Gorica¹, Ivanišević Jasmina¹, Miljković Milica¹, Kotur-Stevuljević Jelena¹, Vuličević Irena², Vunjak Nevenka², Peco-Antic Amira²

¹Department for Medical Biochemistry, Faculty of Pharmacy-University of Belgrade, Serbia

²University Children's Hospital, Belgrade, Serbia

INTRODUCTION

Cardiovascular disease is a significant cause of death and chronic illness in childhood. It is thought that hypoxia in these children reduces the antioxidant reserve capacity, leading to a greater susceptibility to the oxidative stress of ischemia.

OBJECTIVES

The aim of our study was to estimate oxidative stress status in heart disease children during surgical treatment and acute heart disease exacerbation.

MATERIALS AND METHODS

We have followed oxidative stress changes in ten children with cardiovascular disease within 24h of a hypoxic event; five patients with congenital heart disease (CHD) underwent cardiac surgery under cardiopulmonary bypass (CS group), while another five critically ill cardiac patients (3 patients with cardiomyopathy, 2 with tachycardia) underwent advanced life support at Pediatric Intensive Care Unit (PIC group). We have measured total oxidant status (TOS) spectrophotometrically with o-dianisidine as a chromogen and prooxidative-antioxidative balance (PAB) was measured as a concentration of hydrogen peroxide in the antioxidant environment with tetramethyl-bensidine.

RESULTS

Repeated measures ANOVA test has showed significant within subject difference for TOS and PAB at $p<0.05$ level (CS: TOS values showed increase from 38.1(25-46) $\mu\text{mol/L}$, through 45(16-129) $\mu\text{mol/L}$ 2h after the operation and fall to 26(9-79) $\mu\text{mol/L}$, 24h after the beginning), while (PIC: TOS values showed stable fall during the hospitalization from starting 64(33-125) $\mu\text{mol/L}$ to 11(4-28) $\mu\text{mol/L}$ 24h later). PAB

showed constantly decrease in CS children (from 77(35-167) U/L before surgery to 19(3-116) U 24h later). In PCI children we have noticed PAB increase (from 56(25-122) U at admission to 71(44-114) U 24h later).

CONCLUSION

This opposite increase – decrease attitude of the two oxidative stress markers in two groups of heart disease children could imply different dynamic of free radical induction before and during surgical treatment, and during acute exacerbation of heart disease illness.

REFERENCES

- [1] Ercan S, Çakmak A, Kösecik M, Erel O. The oxidative state of children with cyanotic and acyanotic congenital heart disease. *Anadolu Kardiyol Derg* 2009; 9: 486-90.
- [2] Bajcetic M, Nikolic-Kokic A, Djukic M, Kosutic J, Mitrovic J, Mijalkovic D et al. Effects of Carvedilol on Left Ventricular Function and Oxidative Stress in Infants and Children with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy: A 12-Month, Two-Center, Open-Label Study. *Clin Therap* 2008; 30.
- [3] Alamdari D H, Mobarhan MG, Tavallaie S, Parizadeh MR, Moohebaty M, Ghafoori F, et al. Prooxidant-antioxidant balance as a new risk factor in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clin. Biochem.* 2008; 41: 375-380.
- [4] Erel O; A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation; *Clinical Biochemistry* 2004; 37:227-285.

OXIDATIVE STRESS STATUS IN CHILDREN WITH PYELONEPHRITIS

Predrag Stojakovic¹, Marija Slavkovic¹,
Gorica Banjac¹, Milica Miljkovic¹,
Jasmina Ivanišević¹, Jelena Kotur-Stevuljević¹,
Amira Peco-Antić², Duško Paripović²,
Stanislava Petrović³

¹Department for Medical Biochemistry, Faculty of Pharmacy – University of Belgrade, Serbia

²University Children's Hospital, Belgrade, Serbia

³Health Center "Stari Grad", Belgrade, Serbia

INTRODUCTION

Acute pyelonephritis is an ascending urinary tract infection that has reached the renal pelvis, usually accompanied by infection within the renal parenchyma. It is one of the most common bacterial infection in children. **Imbalance between antioxidants and pro-oxidants** in favor of the pro-oxidants is involved in renal parenchymal inflammatory processes and progressive kidney damage.

OBJECTIVES

The aim of this study was to determine the concentrations of markers of total oxidant and antioxidant status in serum and urine in children during the acute phase, and after normalization of clinical parameters of pyelonephritis, in order to determine the degree of oxidation-stress disorders in pyelonephritis.

MATERIALS AND METHODS

The study included 40 children with acute pyelonephritis. Total oxidative status (TOS) and total antioxidative status (TAS) were measured in serum and urine. The samples were taken after hospital admission and also at discharge in clinically stable condition. TOS was determined by spectrophotometric method with o-dianisidine as a chromogen; TAS by colorimetric assay using a stable ABTS + cation as chromogene.

RESULTS

Our results showed that the concentration of serum TOS in children with pyelonephritis in acute phase of disease was significantly higher compared to values at discharge ($36 \pm 15.8 \mu\text{mol/L}$ vs. $29 \pm 15.8 \mu\text{mol/L}$ $P < 0.05$). Urine TOS values were slightly higher in the acute phase, but the difference was not statistically significant. TAS values were not significantly different either in serum or in urine.

CONCLUSION

The results showed that the values of TOS in children in the acute phase of pyelonephritis were significantly higher, which indicates that TOS increase could be a marker of tissue damage during pyelonephritis. TAS is not a good indicator of antioxidative protection in acute pyelonephritis. This parameter is the sum of all reducing substances in circulation, urea and uric acid mainly, whose concentration increase in blood due to kidney damage.

REFERENCES

- [1] Erel O; A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation; *Clin. Biochem.* 2004; 37:227-285.
- [2] Erel O; A new automated method for measuring total oxidant status; *Clin. Biochem.* 2005; 38:1103-1111.
- [3] Elitsa Lyubomirova Pavlova, Marusia Illieva Lilova, Varban Minkov Savor; Oxidative stress in children with kidney disease; *Pediatr Nephrol* (2005) 20:1599-1604

DETECTION OF NON-DAIRY FATS AND OILS IN DAIRY PRODUCTS USING GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

Natalija Krušaravska, Jane Bogdanov

Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Sts. Cyril and Methodius University-Skopje, Macedonia

Dairy products represent an important group of food products. The quality and authenticity of dairy products is of enormous importance and reliable methods for uncovering adulteration are necessary. The authenticity of dairy products is usually based on fat content and if declared as such are based on the dairy fat content. One of the most common ways of adulteration is replacing the dairy fat with cheaper non-dairy fats and oils. If other non-dairy fats and/or oils are added/present than they have to be properly detected and in some cases quantified. Triglycerides (triesters of glycerol and fatty acids) represent (97-98%) of the total lipids in the milk and the first step of analysis is the extraction of fat. The preferred method of extraction and determination of total fat is the Rose-Gottlieb method. To obtain the fatty acid profile the extracted fat (mainly triglycerides) is subjected to base-catalyzed transmethylation at ambient temperature, using freshly prepared methanolic potassium hydroxide. The obtained fatty acid methyl esters (FAMES) are then directly subjected to GC-MS analysis, using DB-5 capillary column. The presence of butyric acid C_{4:0} (methyl butyrate) and its concentration is the major criterion for detection and quantitation of adulteration of dairy products with fats and oils. The identity of the FAMES is done by matching the obtained mass spectra with the mass spectra from the NIST library, as well as comparison with authentic standards.

After the transesterification is complete, the analysis should be

performed immediately to prevent evaporation of the volatile methyl butyrate. The absence of short-chain FAMES methyl butyrate (C_{4:0}) and C_{6:0}, and medium-chain FAMES indicates absence of dairy fat. Also, from our experience the ratios of weight % C_{4:0}/C_{6:0}, C_{4:0}/C_{8:0}, C_{4:0}/C_{10:0} and C_{4:0}/C_{12:0} are good indicator of a pure dairy fat. Low amounts of butyric acid were particularly difficult to quantify and this was accomplished with methyl valerate as internal standard. An interesting source of added non-dairy fat/oil is coconut oil which contains C_{6:0}, C_{8:0} and C_{10:0} and may initially confuse the analyst. However, if one performs careful analysis of the GC data it is easily detected by the increased weight % of methyl laurate (C_{12:0}). Other noteworthy examples of analysis of milk products will be presented. We have found that addition of Na₂SO₄ and NaHSO₄ after the transesterification and prior to the GC-MS analysis extends the lifetime of the capillary columns.

капронат (C_{6:0}) како и отсуството на C_{8:0} и C_{10:0} укажува дека воопшто нема млечни маснотии. Исто така, од наше искуство соодносот на масените удели C_{4:0}/C_{6:0}, C_{4:0}/C_{8:0}, C_{4:0}/C_{10:0} и C_{4:0}/C_{12:0} е добар индикатор за чистотата на млечната маснотија. Особено тешко се квантифицива метил бутиратот кога е присутен во ниски концентрации и тоа се постигнува со метил валерат, C_{5:0}, како внатрешен стандард. Интересен и често користен додаток во млечните производи е кокосовото масло кое содржи C_{6:0}, C_{8:0} и C_{10:0} и првично може да го збуди аналитичарот. Но, ако се направи детална анализа на податоците од гас хроматографската анализа, лесно може да се детектира присуството на кокосовото масло по зголемиот масен удел на метил лауратот (C_{12:0}). Утврдено е дека додавањето на NaHSO₄ и Na₂SO₄ по трансестерификацијата, а пред GC-MS анализата го продолжува рокот на траење на капиларните колони.

ДЕТЕКЦИЈА НА МАСТИ И МАСЛА ОД ДРУГО ПОТЕКЛО ВО МЛЕЧНИ ПРОИЗВОДИ СО ГАСНА ХРОМАТОГРАФИЈА-МАСЕНА СПЕКТРОМЕТРИЈА

Наталија Крушаровска, Јане Богданов

¹Институт за хемија, Природно-математички факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје, Македонија

Млечните производи претставуваат важна група на прехранбени производи. Квалитетот и автентичноста на млечните производи се од енорно значење и веродостојни методи за откривање на фалсификати и додатоци се неопходни. Најчесто автентичноста на млечните производи се одредува според содржината на маснотии и ако е декларирана како такава се базира на содржината на млечни маснотии. Еден од најчестите начини за фалсификување е делумна или потполна замена на млечната маст со поефтини масти и масла. Ако други масти и/или масла се додадени/присутни тие треба соодветно да се детектираат и во некои случаи да се квантифициваат. Триглицеридите (триестери на глицерол и масни киселини) претставуваат (97-98%) од вкупните липиди во млекото и првиот чекор во анализата е екстракција на млечната маст. Преферирана метода на екстракција и одредување на вкупното количество на млечни масти е таа според Rose-Gottlieb. За да се добие масно-киселинскиот профил екстрахираните триглицериди се подвргнуваат на базно-катализирана трансестерификација на собна температура со свежо приготвен раствор на калиум хидроксид во метанол. Добиените метил естери на масните киселини (анг. fatty acid methyl ester, FAME) директно се анализираат со гасна хроматографија-масена спектрометрија (GC-MS), користејќи капиларна DB-5 колона. Присуството на бутерната киселина C_{4:0} (метил бутират) и нејзината концентрација е главен критериум за детекција и одредување на автентичноста на млечните производи. Идентитетот на метил естерите на масните киселини, FAMES е одреден преку споредба на добиените масени спектри со тие од NIST библиотеката, како и со споредба со автентични примероци.

GC-MS анализата треба да се изведе веднаш по трансестерификацијата за да се избегне губитокот на испарливиот метил бутират. Отсуството на нижите метил естери, метил бутират (C_{4:0}) и метил

VALIDATED HPLC-PDA METHOD FOR DETERMINATION OF TRAMADOL IN HUMAN SERUM

Snežana Đorđević, Vesna Kilibarda

Poisoning Control Centre, Military Medical Academy

Tramadol is a centrally acting opioid analgesic, used in treating moderate to severe pain. The drug has a wide range of applications. It possesses weak agonist actions at the μ -opioid receptor, releases serotonin, and inhibits the reuptake of norepinephrine.

Tramadol provides analgesia through 3 mechanisms: μ -opioid binding (through its metabolite O-desmethyltramadol), serotonin reuptake inhibition (through (+)-tramadol) and norepinephrine reuptake inhibition (through (-)-tramadol).

After oral administration, tramadol is rapidly and almost completely absorbed. Peak serum concentration are achieved in about 2 h. The therapeutic plasma concentration after administration of 50 mg of tramadol is between 100 and 300 ng/ml, being almost completely and quickly absorbed through a metabolism. The toxic tramadol concentration is 1 mg/L, and lethal 2 mg/L.

Tramadol abuse is becoming more popular, mainly because in most countries tramadol is the only available non-scheduled opiate. Being an opioid, tramadol carries all possible risks known from other opiates. Tramadol causes respiratory depression, although usually weaker than that seen with other opiates, such as heroin.

Because of many cases of tramadol abuse in our country, it was necessary to develop a routine analytical method for monitoring its concentration in poisoned patients.

Liquid chromatographic techniques are mostly used for detection and quantitation of tramadol. The aim of this work was to validate HPLC-PDA method for determination and monitoring of tramadol concentration in human serum in acute poisoned patients.

Determination of tramadol was performed by high performance liquid chromatography with photodiode array detection (HPLC-PDA). Mobile phase composed of phosphate buffer (pH = 3.6) and acetonitrile was set up using gradient flow from 1 – 1.5 mL/min.

The stock tramadol solution was prepared by solving 10 mg of tramadol in 10 mL methanol. Working standard solutions were prepared by dissolving stock solution with methanol. Calibration curves were

prepared by spiking blank human plasma samples with tramadol working standard solutions. Serum samples were prepared by neutral solid-phase extraction on Oasis HLB cartridges with methanol as eluent.

Separation of tramadol from matrix compounds and possible present other drugs was done on C8 column, with safety guard column C18, operated at 30°C. Relative retention time was 10.6 min.

Identification of tramadol has done by comparison of analyte spectrum with library of UV spectrums. Qualitative and quantitative analysis of tramadol was performed on $\lambda = 200.5$ nm.

Described method was linear in the range of concentration from 0.05 to 1.5 mg/L. The limit of detection and limit of quantitation for tramadol in serum were 0.03 mg/L, respectively. The mean recovery from serum spiked by tramadol after neutral solid phase extraction was 89.25 %, and was in the range from 79.65 to 99.22 %.

Calculation of tramadol concentration has done on the basis of calibration curve which has gotten after analysis of serum spiked by tramadol standard solution ranged from 0.05 to 1.5 mg/L.

Thanks to library of UV spectrum about 1000 drugs and their metabolites, described method could be used not only for determination of tramadol, but also for identification possibly presented other drugs in blood samples of acute intoxicated patients.

Described HPLC-PDA method is simple, precise and accurate and could be applied for determination of tramadol concentration in serum in order to monitor safety of its therapeutically application, possible abusing, or to confirm a diagnosis of poisoning and to assist in a forensic investigation of a case of fatal overdose.



**МЕДИЦИНСКИ
И АРОМАТИЧНИ РАСТЕНИЈА**
орални презентации

**MEDICINAL
AND AROMATIC PLANTS**
oral presentations

APPLICATION OF NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (NMR) METHODS FOR STRUCTURE ELUCIDATION OF NATURAL PRODUCTS

Slobodan Milosavljević

Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 16,
11000 Belgrade, Serbia

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is acknowledged as a major analytical tool for structure determination of chemical compounds for several years. The potential of the method has been substantially increased due to a number of developments over the last two decades such as: (a) *increase in magnetic field strength*, (b) *indirect observation of heteronucleides* (e.g. ^{13}C and ^{15}N) via proton-detection (so-called *inverse detection*), (c) routine application of *two-dimensional (2D) methods* on daily basis, (d) application of *pulsed field gradients (PFG)* for clean signal selection, (e) wider use of sophisticated *data processing*, (f) a continuous *increase in sensitivity* leading to a substantial reduction of the amount of sample, so nowadays NMR experiments can be performed on microgram quantities for medium and small size compounds (<1000 Daltons) as typical in natural products. reduced and (f) development of *coupled (hyphenated) analytical techniques*, such as liquid chromatography-NMR spectroscopy (LC-NMR).

The application of 2D NMR techniques, revealing connectivities based on structural and spatial proximities (scalar and dipolar couplings, respectively), in many cases also enable resolution of the overlapped NMR signals. The most popular current 2D NMR experiments for small molecules are listed below:

a) Homonuclear correlation

(i) **H,H-COSY (CO**related **S**pectroscop**Y**), connectivity via scalar (J) coupling through chemical bonds.

(ii) **NOESY (N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscop**Y**)/**EXSY (EX**change **S**pectroscop**Y**), connectivity via dipolar coupling (through space $r < 4 - 5 \text{ \AA}$) or chemical (conformational) exchange, respectively.

(iii) **TOCSY (TO**tal **C**orrelation **S**pectroscop**Y**), or **HOHAHA (HO**monuclear **H**Artman **HA**hn spectroscopy), connectivity among all spins from the J -coupling network, e.g. protons in a single amino acid from a peptide.

b) Heteronuclear correlation (HETCOR) with proton (inverse) detection

(i) **HSQC (H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence) and **HMQC (H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**oherence), connectivity between heteronuclei (e.g. $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ or $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$) via direct scalar coupling ($^1J_{\text{C,H}}$ or $^1J_{\text{N,H}}$).

(ii) **HMBC (H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation), connectivity between heteronuclei (e.g. $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$) via long-range scalar coupling ($^2J_{\text{C,H}}$ or $^3J_{\text{C,H}}$).

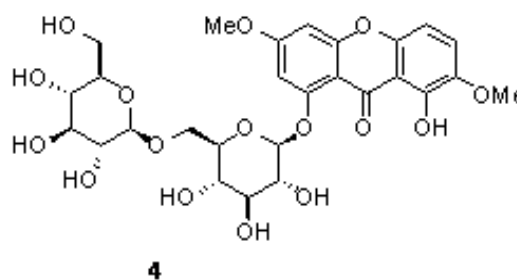
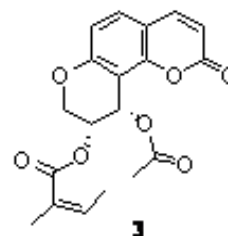
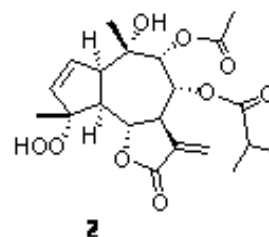
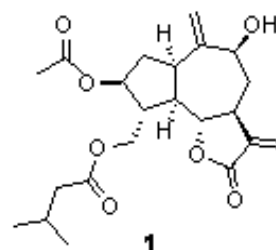
In this lecture the potential of the 2D NMR experiments listed above is demonstrated on few selected examples of natural products such as *sesquiterpene lactones* (**1** and **2**), a *coumarin* (**3**) and a *xanthone* (**4**) isolated from plant species *Amphoricarpos autariatus*, *Anthemis carpatica* (Asteraceae), *Seseli montanum* ssp. *tommasinii* (Apiaceae) and *Swertia punctata* (Gentianeae), respectively, as a part of our com-

prehensive project regarding secondary metabolites of wild growing plants aimed at discovery of new compounds of pharmacologic interest (reviewed in refs. 1 - 4).

In addition, a brief overview of possibilities and recent developments of LC-NMR, a coupled (hyphenated) technique which has emerged since the mid 1990s, is presented in this lecture. The coupling of high performance liquid chromatography with nuclear magnetic resonance spectroscopy (LC-NMR) is one of the most powerful methods for the separation and structural elucidation of unknown compounds in mixtures. An analysis of the future development of the technique with respect to its application in phytochemical analysis is presented.

REFERENCES

- S. Milosavljević, V. Vajs, V. Bulatović, D. Djoković, I. Aljančić, N. Juranić and S. Macura, "Application of two-dimensional nuclear magnetic resonance methods for structure elucidation of sesquiterpene lactones (guaianolides) from *Anthemis carpatica* and diterpenes (kauranes) from *Achillea clypeolata*", *Recent Res. Devel. in Phytochemistry*, **2**, 383-395 (1998)
- S. Milosavljević, V. Bulatović and M. Stefanović, "Sesquiterpene lactones from the Yugoslavian wild growing plant families Asteraceae and Apiaceae", *J. Serb. Chem. Soc.* **64**, 397-442 (1999)
- I.S. Aljancic, V.E.Vajs, V. V. Tesevic, S. M. Milosavljevic, "Some Wild-Growing Plant Species from Serbia and Montenegro as the Potential Sources of Drugs", *Current Pharmaceutical Design*, **14** (29): 3089-3105 (2008)
- K. Šavikin, T. Janković, D. Krstić-Milošević, N. Menković, S. Milosavljević, Secondary Metabolites and Biological Activities of some *Gentianeae* Species from Serbia and Montenegro, Studium Press LLC, USA, *Comprehensive Bioactive Natural Products Extraction, Isolation & Characterization*, **Vol. 6**, 323-340 (2010)



THE SURVEY OF SPECIES, BELONGING TO GENTIANACEAE FAMILY OF CENTRAL BALKANS, PHARMACOGNOSTICALLY INTERESTING

Nebojša Menković

The Institute for medicinal plant research "Dr Josif Pančić" – Belgrade, Serbia

Family Gentianaceae comprises 87 genera and ca. 1600 species. The largest genera are *Gentiana* (360 species), *Gentianella* (250 species), *Swertia* (135 species), *Centaurium* (50 species). At the same time these genera are pharmacognostically most interesting.

The Gentianaceae species are cosmopolitan and are distributed throughout the world, mainly at the mountains of northern hemisphere, in temperate and arctic region. Besides, they can be found at high mountains of tropic regions and Andes, as well as in New Zealand, Tasmania, south Australia, and in Africa, although in these regions they are not abundant.

In European flora 9 genera belonging to family Gentianaceae are listed. As far as pharmacognosy and chemotaxonomy is concerned the most important genera are: *Gentiana* and *Gentianella*, containing 51 species classified into 11 sections, *Centaurium* (12 species, 4 sections), as well as two members of genus *Swertia*.

The area of central Balkans (Montenegro, Macedonia, Bulgaria and Serbia) is inhabited by 4 members of genus *Centaurium* classified in two sections, 23 species of *Gentiana* and *Gentianella* (seven sections) and two species of *Swertia* (one section).

It is well known that these genera synthesize xanthenes, secoiridoids and flavone-C-glucosides, as main secondary metabolites. The fact that xanthenes are not widespread in plant world but are the most abundant in Gentianaceae and Guttiferae families, gives them important role as chemotaxonomic markers (especially for these two families). Hitherto investigation of xanthone distribution in Gentianaceae was mostly focused on genera *Centaurium*, *Gentiana*, *Gentianella* and *Swertia*.

The substitution pattern of xanthenes and the types of substituents, are rather characteristics for particular genus. For example, xanthone-O-glycosides are chemotaxonomically important in genus *Gentiana*. The structure investigation of saccharide units bonded to xanthenes in *Gentiana*, *Gentianella*, *Gentianopsis* and *Swertia* pointed out some differences among the genera.

The active principles of Gentianaceae are xanthone, flavonoids and secoiridoids, exhibiting various interesting biological activities which makes these family very important from pharmacognostic point of view. In this lecture the results of our investigations regarding secondary metabolites of the species from central Balkans belonging to family Gentianaceae will be presented.

APPROACHES IN PHARMACOGNOSY RESEARCH

Gjose Stefkov, Svetlana Kulevanova

Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University "Ss. Cyril and Methodius", Skopje, R. Macedonia

Pharmacognosy research areas are continuing to expand, and now include aspects of cell and molecular biology in relation to natural products (NP), ethnobotany and phytotherapy, in addition to the more traditional analytical method development and phytochemistry.

The Institute of Pharmacognosy (IP), has undergone significant change in recent years and today represents a highly interdisciplinary educational-scientific entity. The systematic scientific approach offers our pharmacognosy group attractive and diverse areas of research, including:

1. Phytochemistry, whereas the long experience in extraction techniques, excellent laboratory facilities equipped with preparative HPLCs, GC/FID/MS and LC-MS enables our research group an insight into the chemical composition of many wild growing domestic medicinal and aromatic plants (MAPs) with a focus on flavonoids, phenolic acid, phenyl-ethanoids, triterpen saponosides, alkaloids, terpenoids and essential oils.

2. The microscopic evaluation and species verification of MAPs are regularly conducted at IP, as well as microscopic research studies on MAPs (*Sideritis* spp.; *Eringium* spp.) deficient in such data.

3. Development and use of analytical methods for quality control of NP from the marketplace (*Tribulus terrestris*, Poppy, Liquorice) is an important part of our routine activities.

4. The study of the medicinal properties of NP, for the purposes of drug discovery and understanding mechanism of action comprises several steps. A typical protocol to isolate a pure chemical agent from natural origin is bioassay-guided fractionation, meaning step-by-step separation of extracted components based on differences in their physicochemical properties, and assessing the biological activity. The end-goal of the work is to identify which one(s) of the scores or hundreds of compounds are responsible for the observed *in vitro* activity, isolation of a target substance and elucidation of its chemical structure. *In vitro* assays are therefore used to identify chemical components of the crude drug that may rationally be expected to have a given pharmacological effect in humans. Seven flavonoids were identified in the most bioactive fraction of the extract of *Teucrium polium* that showed a distinct insulinotropic effect on INS-1E cells (*in vitro* assay for assessing antidiabetic properties). The final effect of any extract can be a product of the interactions between the constituents and the effect of each constituent on its own. To effectively study the existence and affect of such interactions, scientific studies must examine the effect that multiple constituents. All flavonoids from the *Teucrium* extract were also studied separately and showed a less significant insulinotropic effect on INS-1E cells. Additionally, different antimicrobial and antioxidant (DPPH, radical scavenging) test are applied with purpose of assessing these activities in many aromatic plants and spices, especially in NP with potential use as food preservatives (extracts from Pine, Juniper, Sage, Oregano, Mountain tea).

In vitro activity does not necessarily translate to activity in humans or other living systems. Hepatoprotective and antidiabetic *in vivo* testing of characterized plant extracts (*Teucrium* spp., *Vaccinium* spp., *Centaurium erythraea*, *Arctostaphylos uva ursi*, ect) in normal and SZT diabetic rats were conducted, revealing slightly different results than those obtained *in vitro*.

5. The assessment of the safety and toxicity of any extract, crude drug formulation or NP is obligation before approaching clinical trials on humans. Within our *in vivo* experiments, evaluation of biochemical markers (hepatic and renal enzymes) as well as the histomorphological examination of the vital organs are performed, thus having an insight into safety of the tested extract/NP.

6. IP's phytotherapy research program lays its future focus on incorporating NP into intelligent carriers as a part of its.

7. The ethnopharmacology knowledge of the pharmacological qualities and use of traditional medicinal remedies, its holistic and systematic approach, can serve as an innovative and powerful discovery engine for newer, safer and affordable medicines. Collecting ethnopharmacological data from domestic folk's medicine, have been a continuing project, carried out by IP together with Students Research Association. Another experience shows that utilizing the fact that many bitter herbs are traditionally applied as antidiabetics and combining this fact with the chemotaxonomy data, we have obtained excellent choice of *Centaurium erythraea* (bitter plant with chemotaxonomical similarity with *Swertia chirata*-traditionally used antidiabetic herb in India and Japan).

8. Molecular study and manipulation of genetic biosynthetic pathways for the purpose of enhancing the production of natural compounds is in inclination. Chemical synthesis of NP can be extremely difficult and expensive, and isolation from their natural sources is often low yielding. Nowadays, metabolic engineering and synthetic biology offer an alternative approach, as the tools for engineering microbes are further developed. We have modified the existing ergosterol metabolic pathway into the genetically tractable host system *Saccharomyces cerevisiae* that showed high capacity for production of the endogenous isoprene precursors as well as different classes of terpenes from inexpensive sugar-based carbon starting materials. Using these strains we expressed one monoterpene and one sesquiterpene synthase from two *Salvia* species. Besides gene-mining and gene-mapping, employing molecular research in many studies is inevitably nowadays. Molecular characterization of MAPs through molecular markers is important for resolving taxonomic problems (*Sideritis raeseri*/ *S. scardica*/ *S. syriaca*), and is integral part of the data needed in the Genbank conservation program (*Origanum vulgare*, *Salvia* off.) as well as guide through breeding program (*Papaver somniferum*).

9. Enhanced practices and breeding programs for specific agricultural purposes and production of NP. There is ongoing long-term project focused on poppy alkaloids enclosing a breeding program based on botanical, phytochemical and molecular markers;

10. The world is facing extend species extinction due to habitat loss and overharvesting. Along with the species, traditional knowledge of medicinal practices is fast disappearing as well. In the domain of protection/conservation of biodiversity, IP is having one of the crucial roles in founding the National Gene Bank, maintaining and managing the *ex situ* MAPs collection. As species face loss of habitat or overharvesting, there have been new issues to deal with in sourcing crude drugs. These include developing sustainable collection practices (*Vaccinium* spp., *Sideritis* spp.), developing farming practices (*Sideritis raeseri*, Poppy). Promoting organic harvesting has been enduring occupation of IP, encompassing mapping and resource assessment of MAPs (Osogovo Mtn. Blueberries study) as well as MAPs chemical characterization as additional qualities in this value added system. Also IP has a long-standing commitment for chemical characterization of all endemic plants of R.M.

ИСТРАЖУВАЧКИ ПРИСТАПИ ВО ФАРМАКОГНОЗИЈАТА

Ѓоше Стефков, Светлана Кулеванова

Институт за Фармакогнозија, Фармацевтски Факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, Р. Македонија

Фармакогностичките истражувачки области континуирано се експандираат, вклучувајќи аспекти на клеточна и молекуларна биологија во релација со природни продукти (ПП), етноботаника и фитотерапија, како и фитохемија и развој на аналитички методи. Институтот за Фармакогнозија (ИФ) оствари значајни промени во последните години и денес претставува високо интердисциплинарен научно-истражувачки ентитет. Систематскиот научен пристап на нашата фармакогностичка група резултираше со инволвираност во разнообразни и атрактивни истражувачки домени, тука вклучувајќи ги:

1. Фитохемијата, каде што долгогодишното искуство во екстракциски техники, современи лаборатории опремени со препаративни HPLC апарати, GC/FID/MS и LC-MS и овозможуваат на нашата истражувачка група увид во хемискиот состав на многу медицински и ароматични растенија (МАР) со фокус на флавоноидите, фенолните киселини, фенил-етаноидите, тритерпенските сапонозиди, алкалоидите, терпеноиди и испарливите масла.

2. Микроскопска евалуација и верификација на МАР редовно се спроведуваат во ИФ, како и микроскопски студии на МАР (*Sideritis* spp.; *Eringium* spp.) за кои недостасуваат податоци.

3. Развој на аналитички методи за контрола на квалитет на ПП од пазарот (бабин заб, афион, сладок корен) како дел од рутински активности.

4. Проучувањето на медицинските особини на ПП, потрагата по нови лекови и разјаснување на механизмите на делување опфаќа различни истражувања. Биоесеј-водено фракционирање е типичен протокол за изолација на чист хемиски агенс од природно потекло и вклучува сепарација на екстрахираните компоненти врз база на разликите во нивните физичко-хемиски својстваа и проценка на нивната биолошката активност. Крајната цел е да се идентификува/ат компонентите што се одговорни за *in vitro* активноста, за да потоа бидат изолирани и структурно карактеризирани. Во најактивната фракција на испитуваниот екстракт на *Teucrium polium* беа откриени седум флавоноиди што покажаа значаен инсулинотропен ефект врз INS-1E клеточната култура. Крајниот ефект на кој и да е екстракт најчесто е производ на интеракциите помеѓу компонентите. За ефективно да се проучи постоењето и влијанието на ваквите интеракции, научните студии мора да ги испитаат ефектите на многубројните конституенти. Флавоноидите од екстрактот од *Teucrium* беа поодделно испитувани и покажаа помалку значаен инсулинотропен ефект врз INS-1E клетките. Воедно во ИФ се спроведуваат различни антимикробни и антиоксидантни тестови на голем број на МАР, особено кај ПП-потенцијални конзерванси за храна (екстракти од борови, смреки, оригано, планински чај, жалфија), како и *in vivo* хепатопротективни и антидијабетски тестови на екстракти (*Teucrium* spp., *Vaccinium* spp., *Centaurium erythraea*, *Arctostaphylos uva ursi*, итн).

5. Проценка на безбедноста и токсичноста на екстракти, сурова дрога или ПП е задолжително пред отпочнување на клинички студии врз пациенти. Во нашите *in vivo* експерименти се врши и евалуација на биохемиските маркери и хистоморфолошка анализа на витални-

те органи, со што се добива увид во безбедноста на тестираните екстракти.

6. Идните истражувања на ИФ во областа на фитотерапијата се фокусирани кон инкорпорирање на ПП во „интелегентни“ носачи.

7. Етнофармаколошките сознанија за употребата на традиционални лекови, може да послужат во откривање на нови, побезбедни и поефтини лекови. Собирањето на етнофармаколошки податоци од народната медицина е повеќегодишен проект што ИФ го реализира со студентското Научно-истражувачко здружение. Овој пристап даде позитивен резултат во изборот на *Centaurium erythraea* (горчлива билка со хемотаксономски сличности со *Swertia chirata* - традиционално користен антидијабетик во Индија и Јапонија).

8. Молекуларните студии и манипулацијата со генетски биосинтетски патишта се во подем. Хемиската синтеза на ПП може да биде екстремно тешка и скапа, и изолацијата од нивните природни извори е често неисплатлива. Метаболичкото биоинженерство и синтетската биологија денес нудат алтернативен пристап. Така, го модифициравме постоечкиот метаболички пат на ергостеролот во генетски подобен домаќин *Saccharomyces cerevisiae* што покажа висок капацитет за продукција на ендогени изопренски прекурсори како и различни класи на терпени од ефтини шеќери. Со користење на овие соеви постигнавме експресија на една монотерпенска и една сесквитерпенска синтетаза од два вида на *Salvia*. Вклучувањето на молекуларна карактеризација на MAP е значајна за разрешување на таксономски проблеми (*Sideritis raeseri*, *S. scardica*, *S. syriaca*) и е интегрален дел од податоците неопходни за конзервација на генетските ресурси (*Origanum vulgare*, *Salvia off.*) и претставува водич низ селекциски програми (*Papaver somniferum*).

9. Унапредување на земјоделските практици за продукција на ПП. Во тек е долгорочен проект фокусиран на алкалоиди изолирани од афион што опфаќа селекциски програм базиран на ботанички, фитохемиски и молекуларни маркери.

10. Светот се соочува со зголемено исчезнување на видови поради губење на природните хабитати и прекумерно собирање. Заедно со видовите, со голема брзина исчезнуваат и традиционалните знаења. Во заштитата и зачувувањето на биодиверзитетот, ИФ учествуваше во основање на Националната ген банка, како и во одржување на колекцијата на MAP. Постојат нови решенија за одржливо обезбедување на растителни сировини. Ова вклучува развој на одржливи практики за собирање (*Vaccinium* spp., *Sideritis* spp.); култивирање (*Sideritis raeseri*, афион). ИФ го промовира органско производство, што вклучува мапирање и проценка на ресурсите на MAP (студија на боровинките на Осогово) како и хемиска карактеризација на MAP како дополнителен квалитет во овој систем на додадени вредности. Воедно, ИФ има долгорочна определба за хемиска карактеризација на сите ендемски видови во Р. Македонија.

TOXICOLOGICAL RISKS OF HERBAL MEDICINES

Tatjana Kadifkova Panovska¹
and Svetlana Kulevanova²

¹Institute of Applied Biochemistry, Faculty of Pharmacy, UKIM, Skopje, Macedonia

²Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, UKIM, Skopje, Macedonia

In recent years, we have witnessed the increasing growth in popularity of over-the-counter (OTC) health foods, nutraceuticals, and medicinal products from plants or other natural sources in developed countries. This indirectly indicates that the public is not satisfied with their orthodox medical treatment. Such increase in popularity has also brought concerns over the professionalism of practitioners, and quality, efficacy and safety of their treatment methods and products from herbal and natural sources available in the market. About 70-80% of the world populations, particularly in the developing countries, rely in non-conventional medicine in their primary healthcare as reported by the World Health Organization. Physicians are increasingly recommending the use of plant-derived products, partly because of a growing dissatisfaction among consumers with conventional medicines, but also because of the progress made in the chemical, pharmacological and clinical study of herbal medicinal products, the use of innovative galenic forms and the growing importance of self medication. Insufficient data exist for most plants to guarantee their quality, efficacy and safety. The idea that herbal drugs are safe and free from side effects is false. Plants contain hundreds of constituents and some of them are very toxic. The OTC products may be contaminated with excessive or banned pesticides, microbial contaminants, heavy metals, chemical toxins, and for adulterated with orthodox drugs, as well. Excessive or banned pesticides, heavy metals and microbial contaminants may be related to the source of these herbal materials, if they grown under contaminant environment or during collection of these plant materials. Chemical toxins may come from unfavorable or wrong storage conditions or chemical treatment due to storage. The presence of orthodox drugs can be related to unprofessional practice of manufacturers. Some of these environment related factors can be controlled by implementing standard operating procedures leading to Good Agricultural Practice, Good Laboratory Practice and Good Manufacturing Practice for producing these medicinal products from herbal or natural sources. Due to the particular concern of toxicity, poor quality and adulteration of ready-made herbal medicines products in the market the priority of research on product-related treatment, in particular herbal products, is to insure quality, safety and efficacy of the end products used by consumers. For the majority of cases, the biologically active chemical compounds of these entities have been isolated from organic solvents is either too toxic or with no therapeutic activities. Therefore research projects should be centered on development of analytical and biological procedures for use to give the quality assurance and control, and clinical assessment of efficacy and safety of these products. It advocates the establishment of a new category of licensed herbal medicines, prepared in accordance with current Good Manufacturing Procedures, which meet standards of safety and quality, and which are regulated by local government health department that should have reciprocating arrangements with organizations such as the Medicines Control Agency in the UK, FDA in the USA and those in the European Union.

REFERENCES

- Jordan SA, Cunningham DG, Marles RJ., Assessment of herbal medicinal products: challenges and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. *Toxicol Appl Pharmacol*, December 14, 2009.
- WHO. Guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2007.
- WHO. Guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2007.
- WHO. Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2003.
- WHO. Guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

ТОКСИКОЛОШКИ РИЗИЦИ НА ХЕРБАЛНИ ПРЕПАРАТИ

Татјана Кадићкова Пановска¹
и Светлана Кулеванова²

¹Институт за применета биохемија, Фармацевтски факултет,
УКИМ, Скопје, Македонија

²Институт за фармакогнозија, Фармацевтски факултет,
УКИМ, Скопје, Македонија

Во последно време, сведоци сме на зголемена популарност на ОТЦ препаратите (препарати кои се издаваат без рецепт) од тип на здрава храна, нутрацеутици и медицински производи од растенија или од друг природен извор. Ова индиректно упатува на фактот дека луѓето не се задоволни со вообичаениот медицински третман. Зголемувањето на популарноста на овој тип препарати исто така предизвикува загриженост и за професионализмот на лекарите, квалитетот, ефикасноста и безбедноста на нивните методи на третман, како и на производите од растителни и природните извори присутни на пазарот. Околу 70-80% од светската популација, особено од земјите во развој, се потпира на неконвенционалната медицина во примарната заштита, според извештаите на Светската Здравствена Организација. Лекарите се повеќе препорачуваат употреба на производи од растително потекло, делумно поради зголеменото незадоволство меѓу корисниците на конвенционалната медицина, но исто така и поради развојот направен во поглед на хемиските, фармаколошките и клиничките испитувања на хербалните медицински производи, употребата на оригинални галенски форми и зголеменото значење на самомедицијата. За многу растенија не постојат доволно податоци кои би го гарантирале нивниот квалитет, ефикасност и безбедност. Концепцијата дека хербалните лекови се безбедни и без несакани ефекти е неистинита. Растенијата содржат стотици состојки, а некои од нив се многу отровни. ОТЦ препаратите можат да бидат контаминирани со прекумерни дози на пестициди или со забранети пестициди, микробиолошки контаминенти, тешки метали, хемиски отрови и исто така да се фалсификувани со традиционалните лекови. Прекумерните дози на пестициди или забранетите пестициди, тешките метали и микробиолошките контаминенти можат да се поврзани со изворот на хербалните сировини, ако тие растат во загадена животна средина или се загадени во текот на нивното собирање. Хемиските отрови можат да потекнуваат од непогодните или лошите услови на чување или од хемиски третман во тек на чувањето. Присуството на традиционалните лекови може да се поврзе со непрофесионално производство. Некои од овие фактори од животната средина можат да бидат контролирани со имплементирање на стандардни оперативни процедури за произ-

водство на овие медицински производи од растителни или други природни извори, како што се Добра Земјоделска Пракса, Добра Лабораториска пракса и Добра Производствена Пракса. Поради посебната загриженост за токсичноста, незадоволителниот квалитет и фалсификувањето на готовите хербални производи на пазарот, приоритетот на истражувањата за одредени хербални продукти е усмерен кон обезбедување на квалитет, безбедност и ефикасност на крајниот продукт што се користи од потрошувачите. За голем број случаи, биолошки активната хемиска компонента која се изолира со органски растворувач е или многу токсична или без терапевтска активност. Според ова, истражувачките проекти треба да се усмерат кон развивање на аналитички и биолошки процедури кои ќе обезбедат контрола на квалитетот, како и клиничко проценување на ефикасноста и безбедноста на овие производи. На овој начин ќе се поткрепи воспоставувањето на нова категорија на лиценцирани хербални лекови, подготвени во согласност со постоечката Добра Производствена Пракса, која ќе ги задоволи стандардите за безбедност и квалитет и која ќе биде регулирана од локалните владини институции кои се еквивалент на организациите како Агенцијата за Контрола на Лекови во Велика Британија, FDA во САД и соодветни институции во земјите од Европската Унија.

ЛИТЕРАТУРА

- Jordan SA, Cunningham DG, Marles RJ., Assessment of herbal medicinal products: challenges and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. *Toxicol Appl Pharmacol*, December 14, 2009.
- WHO. Guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2007.
- WHO. Guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2007.
- WHO. Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2003.
- WHO. Guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

ANTIAGGREGATORY EFFECT OF FLAVONOIDS

Marica Medić-Šarić, Mirza Bojić

University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry,
Department of Medicinal Chemistry, A. Kovačića 1,
HR-10000 Zagreb, Croatia

INTRODUCTION

Leading causes of death in developed countries are cardiovascular diseases. Polyphenols, namely flavonoids and phenolic acids, have many pharmacological properties that can explain their protective role in the prevention of cardiovascular diseases: antioxidant capacity, vasorelaxation, anti-inflammatory and antiaggregatory effects. Beneficial effects of natural sources of polyphenolics on platelet aggregation such as wine (French paradox), green tea (Asian paradox), dark chocolate, ginkgo, propolis are well documented. [1,2] Although antiaggregatory activity of flavonoids is well known property of these compounds, the results of a systematic search for highly potent members of this family are still missing.

MATERIALS AND METHODS

In order to analyze the antiaggregatory activity of series of flavonoids

(n = 10), namely: 3,7-dihydroxyflavone, 6-hydroxyflavone, acacetin, epicatechin, genistein, hesperetin, isorhamnetin, pinocembrin, pinocembrin-7-methylether, tectochrysin. Platelet impedance aggregation in whole blood has been selected for measurement of the platelet aggregation while the ADP has been used as an aggregation agonist. The whole blood was obtained from healthy volunteers. A total number of 30 volunteers participated in this research that was approved by ethical committees of Croatian Institute of Transfusion Medicine and Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The biological end point was defined as minimal concentration of flavonoid that can lower the platelet aggregation statistically compared to the control.

RESULTS AND DISCUSSION

The minimal concentration of flavonoid that produces antiaggregatory effect ranged from 0.95 μM to 30.5 μM (p < 0.05); Figure 1.

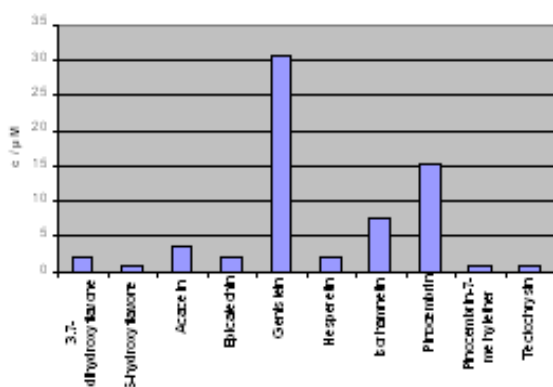


Figure 1. Minimal concentration of flavonoid that can produce antiaggregatory effect.

The following members among analyzed flavonoids show the most potent antiaggregatory effect: epicatechin, 6-hydroxyflavone, tectochrysin with minimal concentrations that lowers platelet aggregation of 1.9, 0.95 and 0.95 respectively.

Among the analyzed flavonoids the most potent members possess following structural properties: double bond on position C2-C3 and hydroxyl group on position C3 of the ring C (flavonols), Figure 2.

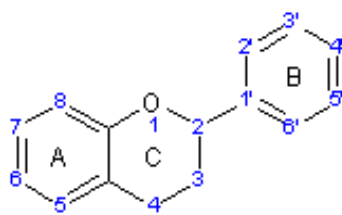


Figure 2. Basic structure of flavonoids.

Having in mind the daily consumption of flavonoids of up to 50 mg per day in normal diet [3], flavonoids can achieve micromolar levels in blood. Using coupled techniques e.g. HPLC-MS micromolar levels of individual flavonoids have been confirmed *in vivo* [4].

Thus the results of this research suggest that even daily consumption of flavonoids can effect aggregation of platelets.

CONCLUSION

Flavonoids can effect platelet aggregation in concentrations that can

be achieved in every day diet. As flavonoids are widely distributed in plant kingdom, diet should be taken into account when interpreting platelet aggregation and coagulation results.

REFERENCES

[1] J.A. Guerrero, M.L. Lozano, J. Castillo, O. Benavente-García, V. Vicente, J. Rivera, *J. Thromb. Haemost.*, **3**, 369-376 (2005).
 [2] P. Pignatelli, F.M. Pulcinelli, A. Celestini, L. Lenti, A. Ghiselli, P.P. Gazzaniga, F. Violi, *Am. J. Clin. Nutr.*, **72**, 1150-1155 (2000).
 [3] G.G. Duthie, S.J. Duthie, J.A. Kyle, *Nutr. Res. Rev.*, **13**, 79-106 (2000).
 [4] K.S. Krogholm, L. Bredsdorff, P. Knuthsen, J. Haraldsdóttir, S.E. Rasmussen, *Eur. J. Clin. Nutr.*, **64**, 432-435 (2010).

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PINUS PEUCE GRISEB. ESSENTIAL OILS

Marija Karapandzova¹, Gjose Stefkov¹,
 Elena Trajkovska-Dokik², Ana Kaftandzieva²,
 Svetlana Kulevanova¹

¹Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University "Ss. Cyril and Methodius", Skopje, Macedonia
²Institute of Microbiology, Faculty of Medicine, University "Ss. Cyril and Methodius", Skopje, Macedonia

Although the biological activity of essential oils is well known, the mode of their action is not completely understood. Generally, the activity of essential oils is the result of combined effect both of their active and inactive components. Inactive components may affect resorption, speed of reaction and bioavailability of active components (1, 8), while the active components can have a synergistic effect. The essential oils are familiar with antibacterial, antifungal and antiviral activity. Many studies have explained antibacterial activity of essential oils against Gram-positive and Gram-negative bacteria (6, 11, 5, 12, 2, 9) and have confirmed their antifungal activity (3). There are differences in the biological activity of essential oils, especially when it comes to different strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria. The different susceptibility of bacteria to the action of essential oils are not only due to a different chemical composition of the oils, but the differences in the composition and structure of the cell wall, lipid and protein composition of cytoplasmic membrane and specific physiological processes in different bacterial species. The way and mechanism of antibacterial activity of essential oils are not sufficiently explained yet. Nowadays, it is accepted that some essential oils and their components mainly act on bacterial cytoplasmic membrane (10). Literature data suggest a correlation between biological activity of oils and chemical characteristics of their components. Generally, strong antibacterial activity of essential oils due to the presence of certain mono and sesquiterpenes (4, 13, 7).

Essential oils from different pine species have antibacterial and antifungal activity, thus the aim to this study was to investigate antimicrobial activity of *Pinus peuce* essential oils against certain types of microorganisms that affect respiratory, gastrointestinal and urogenital system and the skin.

Examination of antimicrobial activity was made on samples of terminal branches of *Pinus peuce* that were collected on three different localities in the country: Pelister, Nidze and Shara Mountain. Three samples were obtained by separating the needles from the branches:

branches without needles, branches with needles and only needles. Isolation of essential oils was made by hydodistillation in all Clevenger apparatus from 20 g plant material for 4 hours. Antimicrobial activity of essential oils was studied against 14 different microorganisms, including 13 bacterial isolates representing both Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* and *Enterococcus*) and Gram-negative bacteria (*Acinetobacter* spp, *Escherichia coli* ATCC 25927, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Haemophilus influenzae* and *Proteus mirabilis*) and one strain of *Candida albicans* ATCC 10231. Hole-plate method was used for screening the antimicrobial activity of all essential oils (determination of growth inhibition zones of studied microorganisms that occur around certain essential oil). This investigation was followed by broth dilution method (determination of minimal inhibitory concentration MIC of the particular oil).

The most sensitive bacteria against tested needle essential oils were *Streptococcus pneumoniae*. Compared with sensitivity to the effects of essential oils isolated from needles, bacteria showed higher sensitivity to essential oils isolated from branches without needles. The highest sensitivity to the effects of these essential oils, beside *Streptococcus pneumoniae*, showed *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*. Susceptibility of microorganisms to the effects of essential oils isolated from branches with needles is much different in terms of susceptibility to the essential oils isolated from needles and from branches without needles. The highest sensitivity to the effects of essential oils isolated from branches with needles showed *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus* and *Candida albicans*. These oils also showed the highest activity (essential oil isolated from branches with needles from Nidze and Shara Mtn).

REFERENCES

1. Colgate SM, Molyneux RJ. (1993) Bioactive Natural Products – Detection, Isolation and Structural Determination. *CRC Press: Boca Raton*: 9-34.
2. Dorman HJ, Deans SG. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88: 308-316.
3. Hammer K, Carson CF, Riley TV. (1998) In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products against *Candida* sp.. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 591-595.
4. Oluwadayo Sonibare O, Olakunle K. (2008) Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Pinus caribaea* from Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 7 (14): 2462-2464.
5. Reichling J, Harkenthal M, Saller R. (1999) In-vitro-Untersuchungen zur antimicrobiellen Wirkung ausgewählter ätherischer Öle. *Erfahrungsheilkunde* 48: 357-366.
6. Reichling J. (1999) Plant-microbe interaction and secondary metabolites with antiviral, antibacterial and antifungal properties; In: Wink M, ed. *Functions of Plant Secondary Metabolite and their Exploitation in Biotechnology*. Annual Plant Review. Sheffield: Sheffield Acad. Press: 187-273.
7. Sacchetti G, et al. (2005) Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 91: 621-632.
8. Svoboda KP, Deans SG. (1995) Biological activity of essential oils from selected aromatic plants. *Acta Hort* 390: 203-209.
9. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, et al. (2004) A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 19: 61-64.
10. Ulrich F, Jurgen S. et al. (2008) Efficacy, absorption and safety of essential oils. *Dermatologic, Cosmeceutic, and Cosmetic Development*: 401-418.
11. Weseler A, Greiss HK, Saller R, et al. (2005) A novel colorimetric broth microdilution method to determine minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics and essential oils against *Helicobacter pylori*. *Pharmazie* 60: 498-502.
12. Youesf R, Tawil G. (1980) Antimicrobial activity of volatile oils. *Pharmazie* 35: 698-701.
13. Youg-Suk K, Dong-Hwa Sh. (2005) Volatile components and antibacterial effects of pine needle (*Pinus densiflora* S. and Z.) extracts. *Food Microbiology* 22: 37-45.

АНТИМИКРОБНО ДЕЈСТВО НА ЕТЕРИЧНО МАСЛО ОД МОЛИКА (*PINUS PEUCE GRISEB.*)

Марија Карапанцова¹, Ѓоше Стефков¹,
Елена Трајковска-Докиќ²,
Ана Кафтанџиева², Светлана Кулеванова¹

¹Институт за Фармакогнозија, Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје, Македонија

²Институт за Микробиологија, Медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје, Македонија

Иако билшката активност на етеричните масла е добро позната, нивниот начин на дејство не е сосема разјаснет. Генерално, дејството на етеричните масла е резултат на комбинираниот ефект, како на активните така, и на неактивните компоненти. Неактивните компоненти можат да влијаат врз ресорпцијата, брзината на реакцијата и биорасположливоста на активните компоненти (1, 8), додека активните компоненти можат да имаат синергистичко дејство. За етеричните масла се врзуваат антибактериско, антифунгалното и анти-виралното дејство. Голем број студии ја објаснуваат антибактериската активност на етеричните масла против Грам-позитивни и Грам-негативни бактерии (6, 11, 5, 12, 2, 9), а покрај тоа потврдено е и нивното антифунгално дејство (3). Постојат разлики во биолошката активност на етеричните масла, особено кога се во прашање различни бактериски соеви на Грам-позитивни и Грам-негативни бактерии. Различната осетливост на бактериите кон дејството на етеричните масла се должи не само на различен хемиски состав на маслата, туку и на разликите во градбата и структурата на клеточниот ѕид, липидниот и протеинскиот состав на цитоплазматската мембрана и на специфичните физиолошки процеси кај различни бактериски видови. Начинот и механизмот на антибактериското дејство на етеричните масла сеуште не се доволно објаснети. Денес е прифатено дека етеричните масла и некои од нивните компоненти главно дејствуваат врз бактериската цитоплазматска мембрана (10). Податоците од литературата укажуваат на врската помеѓу биолошката активност на маслата и хемиските карактеристики на компонентите. Генерално, силното антибактериско дејство на етеричните масла се должи на присуство на определени моно и сесквиптерпени (4, 13, 7).

Етеричните масла од различни видови бор покажуваат антибактериска и антифунгална активност. Од тука произлегува и интересот за испитување на антимикуробното дејство на етеричното масло од молика кон определени видови микроорганизми, предизвикувачи на инфекции на респираторен, гастро-интестинален и урогенитален тракт и на инфекции на кожа.

Испитувања на антимикуробната активност се направени на примероци на врвни граничиња од молика, собрани на три локалитети во земјата: Пелистер, Нице и Шар Планина. Од собраниот растителен материјал, со издвојување на листовите (игличките) добиени се по три примерока: гранки со иглички, гранки без иглички и само иглички. Изолација на етеричното масло е направена со дестилација со водена пара во апарат по Клевенџер од 20 g растителен материјал, во време од 4 часа.

Антимикуробна активност на етеричните масла е испитувана на 14 различни микроорганизми, вклучувајќи 13 бактериски изолати на Грам-позитивни (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*,

Streptococcus pyogenes и *Enterococcus*) и Грам-негативни бактерии (*Acinetobacter spp.*, *Escherichia coli* ATCC 25927, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Haemophilus influenzae* и *Proteus mirabilis*) и на еден изолат на габата *Candida albicans* ATCC 10231. За испитување на антимикробно дејство на етеричните масла се користени агар дифузиона (определување на зоните на инхибиција на раст на испитуваните микроорганизми што се јавуваат околу одредено етерично масло) и агар дилуциона метода (определување на минимална инхибиторна концентрација МИК на даденото масло).

Најголема осетливост на дејство на етерични масла од иглички од молика покажа бактеријата *Streptococcus pneumoniae*. Споредено со осетливоста на дејството на етеричните масла од иглички, бактериите покажаа поголема осетливост, кога се во прашање етеричните масла изолирани од гранки без иглички. Најголема осетливост на дејство на овие масла, покрај бактеријата *Streptococcus pneumoniae*, покажаа и бактериите *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и габата *Candida albicans*. Осетливоста на микроорганизмите на дејството на етеричните масла од гранки со иглички од молика е многу поразлична во однос на осетливоста на дејството на етеричното масло од иглички и од гранки без иглички. Најголема осетливост на дејството на маслата од гранки со иглички покажаа бактериите *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus* и габата *Candida albicans*. Воедно, овие масла покажаа и најголема активност (етерично масло изолирано од гранки со иглички од молика од Нице и од Шар Планина).

ЛИТЕРАТУРА

- Colgate SM, Molyneux RJ. (1993) Bioactive Natural Products – Detection, Isolation and Structural Determination. *CRC Press: Boca Raton*: 9-34.
- Dorman HJ, Deans SG. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88: 308-316.
- Hammer K, Carson CF, Riley TV. (1998) In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products against *Candida sp.* *Antimicrob Agents Chemother* 42: 591-595.
- Oluwadayo Sonibare O, Olakunle K. (2008) Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Pinus caribaea* from Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 7 (14): 2462-2464.
- Reichling J, Harkenthal M, Saller R. (1999) In-vitro-Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirkung ausgewählter ätherischer Öle. *Erfahrungsheilkunde* 48: 357-366.
- Reichling J. (1999) Plant-microbe interaction and secondary metabolites with antiviral, antibacterial and antifungal properties; In: Wink M, ed. *Functions of Plant Secondary Metabolite and their Exploitation in Biotechnology*. Annual Plant Review. Sheffield: Sheffield Acad. Press: 187-273.
- Sacchetti G, et al. (2005) Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 91: 621-632.
- Svoboda KP, Deans SG. (1995) Biological activity of essential oils from selected aromatic plants. *Acta Hort* 390: 203-209.
- Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, et al. (2004) A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 19: 61-64.
- Ulrich F, Jurgen S. et al. (2008) Efficacy, absorption and safety of essential oils. *Dermatologic, Cosmeceutic, and Cosmetic Development*: 401-418.
- Weseler A, Greiss HK, Saller R, et al. (2005) A novel colorimetric broth microdilution method to determine minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics and essential oils against *Helicobacter pylori*. *Pharmazie* 60: 498-502.
- Yousef R, Tawil G. (1980) Antimicrobial activity of volatile oils. *Pharmazie* 35: 698-701.
- Yong-Suk K, Dong-Hwa Sh. (2005) Volatile components and antibacterial effects of pine needle (*Pinus densiflora* S. and Z.) extracts. *Food Microbiology* 22: 37-45.

DEVELOPMENT OF NOVEL YEAST STRAINS AS CELL FACTORIES FOR THE PRODUCTION OF PLANT TERPENOIDS

Ivana Cvetkovikj¹, Antonios Makris^{1,2},
Codruta Ignea¹, Gjoshe Stefkov³,
Svetlana Kulevanova³

¹Department of Natural Products and Biotechnology, Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes (CIHEAM). Mediterranean Agronomic Institute of Chania (MAICh), P.O.Box 85, Chania 73100, Greece.

²Institute of Agrobiotechnology/CERTH, P.O.Box 60361, Thessaloniki 57001, Thessaloniki, Greece.

³Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University "Ss. Cyril and Methodius", Skopje, Macedonia.

BACKGROUND

Throughout human history, secondary metabolites from natural foundations have been important sources of aromatic and pharmaceutical compounds which are used till present as commercial flavors, fragrances, medicines (Chang and Keasling, 2006). An important class of natural products, terpenoids and isoprenoids comprise a very large family, exceeding 50.000 different compounds (Buckingham, 2007). Their broaden spectrum of application was important bottleneck in the further exploitation of these compounds by the industry especially due to their limited quantities of production in plants. Over the past decade, a fierce race was initiated to exploit microorganisms and genetically engineered plants as sources for production of these valuable compounds.

As a model for understanding eukaryotic organisms or as a cell factory that offers distinct advantages over bacteria and plants, *S. cerevisiae* (baker's yeast) has taken center stage in these efforts. It has become a major platform for metabolic engineering, through its capacity to produce plant terpenoids, as well as the ability to be subject to further modifications to improve the production yields (Nevogoit, 2008). Previous efforts resulted with production of mono- and sesquiterpenoids at almost 3-fold higher levels than the wild type yeast cells (Ignea, 2009, Ignea *et al.*, 2011).

To achieve commercially exploitable levels, we tested by overexpression, the contribution of several endogenous genes from the sterol biosynthetic pathway which produce the substrates of terpenoid synthases.

MATERIALS AND METHODS

Yeast expression vectors: The following expression plasmids were used for expression in yeast cells: pYES2 (URA3, 2 μ , Gal prom.); pYES2-myc (URA3, 2 μ , Gal prom., myc tag); pJG4-4 (TRP1, 2 μ , Gal prom.); pJG4-6 (TRP1, 2 μ , Gal prom. HA-tag); pYES-ADH1 (URA3, 2 μ , ADH1 prom.); modified pUG27 vector (Guedener *et al.*, 2002) without Xho1 restriction site.
Genes: The open reading frame minus the transit peptide (orf) of *S. fruticosa* cineole synthase 1 (*SfCinS1*, Acc. DQ785793) was PCR amplified from a previously isolated full length cDNA. The yeast gene isoprenyl diphosphate synthase (YPL117c, Acc. NP_015208) was PCR amplified from yeast genomic DNA.

Development of COD4 and COD40 cassettes: The pGAL1-MCS-ts was PCR amplified from pDNR-Gal vector. The insert and the modified pUG27 linearized backbone digested with HindIII and Sall were ligated. The novel cassette was named COD4. The IDI orf was inserted into the pUG27 vector using the EcoRI and XhoI restriction sites at the MCS generating the construct pCOD40.

Terpene production in yeast: Monoterpenes sampling was performed using a Solid Phase Microextraction (SPME) assembly with 2 cm-50/30 um DVB/Carboxen™/PDMS StableFlex™ Fiber for Manual Sampling and were analyzed on Hewlett Packard 5890 II gas chromatograph equipped with flame ionization detector capillary column HB5. The working conditions has been describe previously (Ignea *et.al.*, 2011).

RESULTS AND DISCUSSION

The focus was kept on the yeast sterol pathway gene IDI1 which encodes a dimethylallyl pyrophosphate isomerase. The balance of IPP (isopentenyl pyrophosphate) and DMAPP (dimethylallyl pyrophosphate) was shown to be important for monoterpene production. To this connotation, we used the cre-loxP recombination system adapted molecular tools which enabled us to perform target insertions of the exogenous IDI1 gene into the yeast genome as well as subsequent recycling of the selection marker. Using these strains, plant *SfCinS1*-monoterpene synthase from the sage species *Salvia fruticosa* was expressed. The novel strains were robust, could sustain for an extended period, and give 20-fold increase in monoterpenes than the standard reference strain BY4741. Additionally, maximum monoterpene production levels were obtained with co-expression from plasmids of IDI1 and HMG2 (K6R) variant in the improved strain background. Finally, the effects of media composition in long term production of plant terpenoids in yeast were examined as well as alternative molecular tools and procedures were established for cost reduction and additional terpenoid yield increase.

CONCLUSION

Using the developed molecular tools, new yeast strains were generated with increased capacity to produce mono- and sesquiterpenes that can be further used for production of high value added compounds such as diterpenes, minor constituents of plants with a multitude of biological activities (antioxidants, cytostatic etc.).

REFERENCES

- Buckingham J (2007): Dictionary of Natural Products on DVD. CRC Press.
 Chang, M. C. Y., and Keasling, J. D., (2006): Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nature Chemical Biology*.
 Gueldener U, Heinisch J, Koehler GJ, Voss D, Hegemann JH, (2002): A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, 30(6):e23.
 Ignea C, (2009): Engineering yeast for the production of plant terpenoids and characterization of their biosynthetic enzymes from *Salvia* sp. (Arabidopsis plants overexpressing select antioxidant genes exhibit resistance to oxidative stress and bacterial infection), PhD thesis, University of Crete, Department of Biology, Crete, Greece.
 Ignea C., Cvetkovikj I., Loupassaki S., Kefalas P., Johnson C.B., Kampranis S.C., Makris A.M., (2011): Improving yeast strains using recyclable integration cassettes for the production of plant terpenoids, *Microbial Cell Factories*, 10(4).
 Nevoigt E, (2008): Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(3), 379-412.

TOOLS FOR EXPERIMENTAL DESIGN AND ANALYSIS OF EXTRACTION PROCESS FOR PLANT MATRICES

Jana Klopcheska¹, Renata Slaveska Raichki²,
 Vesna Rafajlovska¹

¹Faculty of Technology and Metallurgy, University of "Ss. Cyril and Methodius", Skopje, Republic of Macedonia,

²Faculty of Pharmacy, University of "Ss. Cyril and Methodius", Skopje, Republic of Macedonia

Numerous research results testify that mass transfer on analytes of interest from natural matrices is often qualified as a complex and the most time consumable step of the integral procedure required for fast, efficient and safe studies of chemical multicomplex systems.

The appropriate choice of conditions for performing the extraction process have to ensure selective and maximum extraction of analytes from the matrix, while at the same time minimizing the eventual changes in their structure [1,2,3,4]. Hence the greater interest for selection and application of mathematical models for defining the individual and interactive influences of certain operational parameters, such as rational approach for designing and analyzing the experiments for conducting processes of extraction is absolutely justified and reasonable [5,6,7].

In our researches, we applied tools for experimental design and analysis of the process for extraction of chlorophylls by using the Stat-Soft software. The maceration has been performed at independent changeable operational conditions, namely at 25°C extraction temperature, dynamic time in the range of change from 1 to 5 days, and quantity of solid and liquid phase from 2-10g and 40-100 mL, respectively, with ethanol as extraction means. The influence of the independent variables on the chlorophylls yield designated as dependent variable has been studied.

The results from the performed statistical analysis and the data obtained from the equations that adequately describe the process of chlorophylls extraction, indicate that the quantity of used extraction means is the most influential factor. The increase of the extraction means quantity has a positive influence on the chlorophyll yield. The influence of the time factor is also positive, but with lesser significance compared to the influence of the extraction means quantity. As concerns the analyzed system, it has been proven that the independent variable of solid phase quantity has a significantly negative influence on the dependent variable. The examinations of interactive influences of independent variables confirm that there is a significant negative influence of the interaction between the quantity of solid phase and time of extraction. This indicates that the process is to be carried out with smaller quantity of solid phase and at shorter phase contact. Data analysis of the interaction of the quantity of extraction means and time has showed that the interaction is positively significant, but with lesser effect compared to the effect of interaction of solid phase quantity and time. The interactive influences of the solid phase quantity and of liquid phase quantity, as well as the interaction of all three studied independent variables on the extracted quantity of chlorophylls are insignificant.

These results contribute to the findings that the application of the tools for experimental design enables determination of the most influential independent variables, as well as definition of the interval of change of the influential factor for achieving the desirable values of dependent variable.

REFERENCES

- Dunn J. L., Turnbull J. D., Robinson S. A., Comparison of solvent regimes for the extraction of photosynthetic pigments from leaves of higher plants, *Funct. Plant Biol.*, 31(2), 195-202, 2004.
- Wang L., Weller C.L., Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends Food Sci. Technol.*, 17(6), 300-312, 2006.
- Hojnik M., Škerget M., Knez Ž., Isolation of chlorophylls from stinging nettle (*Urtica dioica* L.), *Separ. Sci. Technol.*, 57(1), 37-46, 2007.
- Ju Z. Y., Howard L. R., Effects of solvents and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5207-5213, 2003.
- Taralkar S. V., Garkal D. J., Solid-liquid extraction process of active ingredients from medicinal plants-mathematical models, *Int. J. Chem. Sci. Appl.*, 1(2), 82-85, 2010.
- Juntachote T., Berghofer E., Bauer F., Siebenhandl S., The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 41, 121-13, 2006.
- Hismath I., Wan Aida W. M., Ho C. W., Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from neem (*Azadirachta indica*) leaves. *International Food Research Journal-IJFS*, 18, 59-67, 2011.

АЛАТКИ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ДИЗАЈНИРАЊЕ И АНАЛИЗА НА ЕКСТРАКТИВНИ ПРОЦЕСИ ЗА РАСТИТЕЛНИ МАТРИЦИ

Јана Клопческа¹, Рената Славеска Раички², Весна Рафајловска¹

¹Технолошко-металуршки факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје, Република Македонија,

²Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје, Република Македонија

Бројни истражувачки резултати сведочат дека масениот трансфер на аналитите од интерес од природни матрици често се квалификува како сложен и временски најдолготраен чекор од интегралната постапка потребна за брзи, ефикасни и сигурни студии на хемиски мултикомплексни системи. Правилниот избор на условите за водење на процесот на екстракција треба да обезбеди селективно и максимално извлекување на аналитите од матрицата, и притоа да се минимизираат евентуалните промени во нивната структура [1,2,3,4]. Од тука, сосема е оправдано се поголемо насочување на интересите кон избор и примена на математичките модели за определување на индивидуалните и интерактивните влијанија на определени операционски параметри, како рационален пристап за дизајнирање и анализа на експериментите за водење на екстрактивните процеси [5,6,7]. Во нашите испитувања применети се алатки за експериментално дизајнирање и анализа на процесот на екстракција на хлорофилите, користејќи StatSoft софтверски пакет. Мацерацијата е водена при независните променливи операционски услови, и тоа 25°C температура на екстракција, динамичко време во интервал на измена од 1 до 5 дена, и количество на цврста и течна фаза од 2-10g и 40-100 mL, соодветно, со етанол како екстракционно средство. Влијанието на независните променливи во екстракциониот систем е изучувано врз приносот на хлорофилите означен како независна променлива. Резултатите од извршената статистичка анализа и сознанијата добиени од равенките што адекватно го опишуваат процесот на екстракција на хлорофилите, укажуваат дека највлијателен фактор е количеството на употребено екстракционно средство. Зголемувањето на количеството на екстракционото средство позитивно делува


врз приносот на хлорофилите.

Влијанието на факторот време е исто така позитивно, меѓутоа со помала сигнификантност во споредба со влијанието на количеството на екстракционото средство. За испитуваниот систем се покажа дека независната променлива количество цврста фаза е со негативно сигнификатно влијание врз зависната променлива. Испитувањата на интерактивните влијанија на независните променливи потврдуваат дека сигнификатно е негативното влијание на интеракцијата меѓу количеството на цврста фаза и времето на екстракција, што упатува на водење на процесот со помало количество цврста фаза и при пократок фазен контакт. Анализата на податоците за интеракцијата на количеството на екстракционно средство и времето покажа дека истата е позитивно сигнификатна, но со помал ефект во компарација со ефектот на интеракцијата количество цврста фаза и време. За извлеченото количество хлорофилите, интерактивните влијанија на количеството цврста фаза и на количеството течна фаза, како и интеракцијата на сите три проучувани независни променливи се неситнификантни.

Овие резултати одат во прилог на сознанијата дека употребата на алатките за експериментално дизајнирање овозможува определување на највлијателните независни променливи, како и дефинирање на интервалот на измена на влијателниот фактор за постигнување на посакуваните вредности на зависната променлива.

ЛИТЕРАТУРА

- Dunn J. L., Turnbull J. D., Robinson S. A., Comparison of solvent regimes for the extraction of photosynthetic pigments from leaves of higher plants, *Funct. Plant Biol.*, 31(2), 195-202, 2004.
- Wang L., Weller C.L., Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends Food Sci. Technol.*, 17(6), 300-312, 2006.
- Hojnik M., Škerget M., Knez Ž., Isolation of chlorophylls from stinging nettle (*Urtica dioica* L.), *Separ. Sci. Technol.*, 57(1), 37-46, 2007.
- Ju Z. Y., Howard L. R., Effects of solvents and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5207-5213, 2003.
- Taralkar S. V., Garkal D. J., Solid-liquid extraction process of active ingredients from medicinal plants-mathematical models, *Int. J. Chem. Sci. Appl.*, 1(2), 82-85, 2010.
- Juntachote T., Berghofer E., Bauer F., Siebenhandl S., The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 41, 121-13, 2006.
- Hismath I., Wan Aida W. M., Ho C. W., Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from neem (*Azadirachta indica*) leaves. *International Food Research Journal-IJFS*, 18, 59-67, 2011.



**МЕДИЦИНСКИ
И АРОМАТИЧНИ
РАСТЕНИЈА**
постер презентацији

**MEDICINAL
AND AROMATIC PLANTS**
poster presentations

QUANTITATIVE AND MULTIVARIATE ANALYSIS OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS IN SATUREJA MONTANA L. AND S. SUBSPICATA VIS.

R. Jurišić Grubešić, D. Kremer, I. Kosalec, G. Šepić

University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, A. Ko-
vačića 1, HR-10000 Zagreb, Croatia

INTRODUCTION

The genus savory (*Satureja* L.), family Lamiaceae Lindl., includes 30 herbs, sub-shrubs and shrubs distributed in temperate area. Eleven *Satureja* species have been described for Europe and five for Croatia (*S. hortensis* L., *S. cuneifolia* Ten., *S. montana* L., *S. subspicata* Vis., and *S. visianii* Šilić). While *S. montana* is a widely distributed species (Iberian, Italian, Balkan and Krim Peninsula, France, Romania, Turkey, and Syria), *S. subspicata* is an endemic Illyric-Balkan species. The species of genera *Satureja* are well known as aromatic species because of their considerable quantities of the essential oil (Radonić and Miloš, 2003; Rustaiyan et al., 2004; Skočibušić et al., 2006; Čavar et al., 2008; Bezić et al., 2009). Some of *Satureja* species have considerable antimicrobial (Sonboli et al., 2004; Skočibušić et al., 2006; Čavar et al., 2008), antifungal (Sonboli et al., 2004), antiviral (Yamasaki et al., 1998), and antioxidant (Radonić and Miloš, 2003; Čavar et al., 2008) activity. Many of them are used as culinary herbs, flavouring agents in perfumery and cosmetics (Skočibušić et al., 2006), as well as in folk medicine (Sonboli et al., 2004; Redžić, 2007). Above ground parts of *S. montana* and *S. subspicata* in form of infusion are used in folk medicine of Bosnia and Herzegovina for treatment of lymphatic system diseases (Hodgkin syndrome).

OBJECTIVES

The aim of this study was spectrophotometric determination of the phenolic compounds: total polyphenols (TP), tannins (T), and total flavonoids (TF) in fourteen Croatian populations (seven per species) of *Satureja montana* and *S. subspicata*, as well as the multivariate comparison of the obtained results, as a contribution to the chemotaxonomy of both investigated species, especially of the endemic *S. subspicata*.

METHODS

Total polyphenol (TP) and tannin (T) contents were determined by using Schneider's method (1976). This procedure is based on a reaction with Folin-Ciocalteu's phenol reagent (FCR) and spectrophotometric determination of TP and T (indirectly, after precipitation with casein) at 720 nm. The content of total flavonoids of quercetin type (TF) was determined by using the method according to Christ and Müller (1960), which includes hydrolysis of glycosides, extraction of flavonoid aglycones with ethyl acetate and complex formation with AlCl₃ at 425 nm. Statistical analysis was carried out using Principal Component Analysis (PCA) and Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA).

RESULTS

The contents (percentage of the dry mass of herbal material) of TP, T, and TF in aerial parts of the investigated *S. montana* and *S. subspicata* populations significantly varied inside species, depending on the collection site and plant organ used for determination. In both species,

stems generally contained the smallest amount of TP, T, and TF, while the highest content of investigated compounds was obtained for the majority of leaf samples. *S. subspicata* generally contained higher concentration of antioxidant phenolic compounds (TP: 5.96–20.04%; T: 0.21–6.95%; TF: 0.07–0.57%) than *S. montana* (TP: 4.43–12.41%; T: 0.08–4.90%; TF: 0.04–0.40%). As regard to the analyzed phenolic compounds, PCA and UPGMA clearly separated the examined populations of *S. montana* and *S. subspicata* from each other.

CONCLUSIONS

Statistically significant difference was established for the content of polyphenolic compounds in leaves, flowers, and stems between *Satureja montana* and *S. subspicata*, possibly due to genetic characteristic of these species, as well as because of differences between localities (climate, soil, and altitude). Regarding polyphenols in analyzed *Satureja* species, the best results gave the specimens of leaves, so they could be a valuable source of polyphenolic compounds and they probably have a significant antioxidant potential.

REFERENCES

1. Bezić N, Šamanić I, Dunkić V, Besendorfer V., Puizina J. Essential Oil Composition and Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequence Variability of Four South-Croatian *Satureja* Species (Lamiaceae). *Molecules*, Vol. 14 (2009) 925–938.
2. Christ B, Müller KH. Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavanol-derivaten in Drogen. *Archives of Pharmacy*, Vol. 293 (1960) 1033–1042.
3. Čavar S, Maksimović M, Šolić ME, Jerković–Mujkić A, Bešta R. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chemistry*, Vol. 111 (2008) 648–653.
4. Radonić A, Miloš M. Chemical composition and antioxidant test of free and glycosidically bound volatile compounds of savory (*Satureja montana* L. subsp. *montana*) from Croatia. *Nahrung/Food*, Vol. 47 (2003) 236–237.
5. Redžić SS. The ecological aspect of ethnobotany and ethnopharmacology of population in Bosnia and Herzegovina. *Collegium Anthropologicum*, Vol. 31 (2007) 869–890.
6. Rustaiyan A, Feizbakhsh A, Masoudi S, Ameri N. Comparison of the Volatile Oils of *Satureja atropatana* Bung. and *Satureja mutica* Fisch. et C.A. Mey. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 16 (2004) 594–596.
7. Schneider G.. Zur Bestimmung der Gerbstoffe mit Casein. *Archives of Pharmacy*, Vol. 309 (1976) 38–44.
8. Skočibušić, M., Bezić, N., Dunkić, V. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Food Chemistry*, Vol. 96 (2006) 20–28.
9. Sonboli A, Fakhari A, Kanani MR, Yousefzadi M. Antimicrobial Activity, Essential Oil Composition and Micromorphology of Trichomes of *Satureja laxiflora* C. Koch from Iran. *Zeitschrift für Naturforschung C*, Vol. 59 (2004) 777–781.
10. Yamasaki K, Nakano M, Kawahata T, Mori H, Otake T, Ueba N, Oishi I, Inami R, Yamane M, Nakamura M, Murata H, Nakanishi T. Anti-HIV-1 activity of herbs in Labiateae. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 2 (1998) 829–833.

EVALUATION OF SPONTANE AND CULTIVATED FLORA OF "BRIGADE PALACE" PARK

Ajola Mesiti¹, Liri Dinga²

¹Universiteti Amerikan i Tiranës, Fakulteti Mjekësor

²Universiteti i Tiranës, Fakulteti i Shkencave Natyrore, Kopshti Botanik

INTRODUCTION

The Brigade Palace park which is a buffer zone between urban region and the suburbs of Tirana has got an area of 100 ha. The research intends: finding out the spontaneous and cultivated contents of the different kinds of flora; studying the evolution of plants (based on the early data of the park) under the conditions of the urban park; identifying the main plant groups and their principal plant associations; analysing their **anthropotolerance** and their origine; giving out general facts of their eco-biology.

MATERIAL AND METHODS

Different kind of habitats of the park has been examined. There has been collected from the field different kind of unknown species and it has been taken photos for each species with a specific status. For each specie it has defined its parameter of anthropotolerance, origin and biological forme.

RESULTS

The research results: the park has got a flora treasure consisting of 382 species from which 228 species are spontaneous that belong to phytoclimatic shelves of forests and mediterenian bushes. The *Arbuto-Quercetum ilicis* overveils here. There are also 154 cultivated and introduced species. Analysing their status according to IUCN in the Brigade Palace park we have kinds with special status such as: E- (endangered), V (vulnerable), E- (endangered), Ex? (extinted).

CONCLUSION

Our research clearly shows that this park even though surrounded by wall where entry is not allowed for the public, it is under the constant anthropogen influence and an improper management of the park. This research has identified different kinds of plants according to certain ecological indicators.

It also brings into focus that in the park there are different sorts of plants that easily fit themselves to the changes brought by anthropogen influence, which are called neutral urban plants. Their number is always enriching among which there are the so-called urbanophobe plants. The origine of plants is also studied paying attention even to the human influence in the park. Each of these indicators clearly shows the ecological view of the park and its evolution. The permanent anthropogen pressure and the climate changes have influence in the flora of the park. Its maintainance must be carried out in compliance with different consultations of forest specialists and botanists avoiding the available plant association damages.

REFERENCES

1. Coutanceau M. -Encyclopedie des Jardins- Paris 1957
2. Demiri M. - Flora Ekskursioniste e Shqipërisë- ShBLSH Tiranë,1983
3. Dinga L. -Florikultura -ILB, Tiranë, 1976
4. Dinga L. - Luletaria - ILB, Tiranë, 1985
5. Encyclopedie du Monde Vegetale - Paris 1964
6. Ingels E. J. -Ornamental Horticulture -Principles and Practices-Neë York 1985
7. Kalajxhi A. - Vlerësimi i biodiversitetit floristik e fitosociologjik i Parkut Kombëtar (i propozuar) të Dajtit - (disertacion doktrature)- Tiranë,2006
8. Mitrushli I. - Drurët dhe Shkurret e Shqipërisë - Instituti i Shkencave , Tiranë 1955
9. Nau J.- Ball Perennial Manual- Illinois, 1996
10. Northington D. etj.- The Botanical world-Toronto 1984
11. Papanisto K. etj.- Flora e Tiranës -USHT, Tiranë,1962
12. Pumo E. etj. - Gjeografia Fizike e Shqipërisë -ASH., Tiranë,1990
13. Vangjeli J. etj. -Libri i Kuq - ASH. Tiranë 1995
14. Vangjeli J. - Udhëzues Fushor i Florës së Shqipërisë - ASH., Tiranë, 2003
15. Floristic Investigations of Historical Parks in St. Petersburg, Russia*
16. Ruderalization in a Roman Park as a Result of Changing Management*
17. The Nonnative Flora of the Kiev (Kyiv) Urban Area, Ukraine: A Checklist and Brief Analysis*
18. An Overvieë of the Neë York Metropolitan Flora Project*.

FAGOPYRUM ESCULENTUM -ABIOTIC ELICITATION

Tůmová L., Martin J.

Faculty of Pharmacy Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic

INTRODUCTION

Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) is a valuable source of flavonoid of rutin and common buckwheat is an important agricultural plant. Rutin has a hypotensive effect, antioxidant activities and antagonizes the increase of capillary fragility. In Czech Republic, there the cultivation of this plant became more widespread in about 16th century, namely in the poor soils of mountain regions. At present, buckwheat farming in our country goes through a revival. In the last few years obtaining raw plant materials has become increasingly more and more difficult due to a decrease in plant sources, changes in an environment, or other factors.

In vitro cultures have been seen as an alternative source of biologically active compounds (1). Therefore, various methods have been tested to enhance and to initiate secondary metabolite biosynthesis and production of important metabolites in *in vitro* plant cells.

The treatment of plant cells with biotic or abiotic elicitors has been one of the most effective means to improve the yields of secondary metabolites in plant cell cultures (2). The elicitors (heavy metals) tested in former studies to increase secondary metabolite accumulation in plant cell cultures were Pb(NO₃)₂, HgCl₂ or MnSO₄ (3).

OBJECTIVES

The objective of this study was to verify the elicitor effects of CeCl₃ by measuring the content of rutin. The experiments were proceeded in callus and suspension cultures of *Fagopyrum esculentum* treated with 3 concentrations of CeCl₃.

MATERIAL AND METHODS

The callus and suspension cultures were maintained on Murashige and Skoog medium /SH/ in Erlenmeyer flasks supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at a concentration of 10 mg/L as growth regulator. These cultures were cultivated in growth room at 26±1°C under 16 h light and 8 h dark. Suspension cultures were shaken constantly on a shaker at 110-120 rpm. Callus and suspension cultures from the 22th - 31th passages were used. Elicitor CeCl₃ in con-

centration of $4.057 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ (c_1); $4.057 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ (c_2) and $4.057 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ (c_3) was added to callus and suspension cultures 25th day of cultivation. After 6, 12, 24, 48, 72 and 168 hours of elicitor application, the calluses and suspension cells were taken off, dried and the content of rutin was determined using methods of Czech Pharmacopeia 2005 (4). All experimental analyses were carried out in minimum of three independent samples for each elicitation period and each concentration.

RESULTS

Callus and suspension cultures of *Fagopyrum esculentum* did not produce rutin in the 22nd-31st passages. The 3rd-10th passages of callus culture showed 0.023 % rutin production (5).

The maximal content of rutin in callus culture was determined after 6 hours treatment with CeCl_3 in concentration c_1 ($4.057 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$) (Tab 1). Other tested concentrations of elicitor and periods of its action were ineffective. Suspension culture cells exposed to elicitor treatment in various concentrations did not lead to rutin production.

CONCLUSION

Elicitor CeCl_3 seems to be improper elicitor for effecting rutin production in *in vitro* cultures in comparison with other heavy metals used as elicitors.

Tab. 1 Content of rutin (%) in *Fagopyrum esculentum* callus culture after elicitor (CeCl_3) treatment in various concentrations

CeCl_3 conc. (mg/ml)	Time of cultivation after CeCl_3 treatment (hours)	Rutin content (%)
c_1	OK	0
	6	0.06
	12	0
	24	0
	48	0
	72	0
	168	0
c_2	OK	0
	6	0
	12	0
	24	0
	48	0
	72	0
	168	0
c_3	OK	0
	6	0
	12	0
	24	0
	48	0
	72	0
	168	0

OK-control (without elicitor treatment)

Low or any rutin production in *Fagopyrum esculentum* culture *in vitro* could be caused by old age (the 22th– 31th passages) of callus and suspension culture. Other possibility of any rutin production can be using of improper specific abiotic elicitor.

Acknowledgments: The research was supported by Research project MSM 0021620822 and SVV-2010-261-002 grant.

REFERENCES

1. Verpoorte, R., van der Heijden, R., ten Hoopen, H.J.G., Memelink, J.: Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters* 21, 467-479, 1999.
2. Dörnenburg, H., Knorr, D.: Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme Microbiol Technology* 17, 674-684, 1995.
3. Tůmová L., Tůma J., Staňková J.: Heavy metals elicitation and the flavonoid production in *Ononis arvensis* L. culture *in vitro*. *Herba Polonica* 44(1), 27-32, 1998.
4. Compositae authors: Czech Pharmacopeia 2005, 1 and 3 volume, Grada, Prague 2005.
5. Píchová M.: Růstové a produkční charakteristiky *Fagopyrum esculentum* *in vitro*. I. Diploma thesis, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové, 2006.

SCREENING OF SELECTED PAPAVERACEAE SPECIES FOR CHOLINESTERASES INHIBITION AND FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY

Macáková Kateřina, Kratochvílová Eva, Chlebek Jakub, Opletal Lubomír

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Heyrovského 1203, CZ-500 05 Hradec Králové

Alzheimer's disease (AD) is one of the most common type of dementia in elderly patients. Its treatment is based on the knowledge of individual pathogenetic changes, which can be observed in AD patients. One of the therapeutic approach is the use of brain cholinesterases inhibitors, which increase content of acetylcholine in the brain and thus improve neuronal transmission (e.g. galanthamine), hence the searching for new sources of cholinesterases inhibitors is actual now. Many studies also pointed out that the progress of AD is associated with oxidative stress and that the antioxidants can have beneficial effect. Dried herbs of 14 Papaveraceae species (genera *Eschscholzia*, *Dicranostigma*, *Argemone*, *Glaucium*) were extracted by 80% EtOH in ultrasonic bath. These extracts were tested for their human erythrocyte acetylcholinesterase (HuAChE) and human serum butyrylcholinesterase (HuBuChE) inhibition activity with the use of Ellman's reagent [1]. The antioxidant activity was evaluated by means of DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) test using SIA (PC-controlled Sequential Injection Analysis system) method developed in our laboratory [2]. This activity is often attributed to phenolic substances, hence the content of total phenolics was determined with the use of Folin-Ciocalteu reagent [3].

G. elegans exhibited significantly the highest inhibition activity of both HuAChE and HuBuChE with IC_{50} values of 4.27 and 18.52 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Other species showed significantly lower activity. None of the tested species demonstrated significant DPPH free radical scavenging activity. The highest activity was exhibited by *G. squamigerum* > *D. leptopodum* > *E. douglasii* > *E. pulchella*. The free radical scavenging activity correlated with the content of total phenolics moderately

($R^2 = 0.78$).

Most of the tested species, except *G. elegans*, showed relatively low HuAChE and HuBuChE inhibition activity. However, despite this fact all of them can be used for isolation of active substance which could be used as lead structures for design of potential drugs. None of these plants can be considered as appropriate source of antioxidant substances.

REFERENCES

1. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. (1961) *Biochem Pharmacol*, 7:88-95.
2. Polášek M, Skála P, Opletal L, Jahodář L. (2004) *Anal Bioanal Chem*, 379:754-758.
3. Singleton VL, Rossi JA. (1965) *Am J Enol Viticult*, 16:144-158.

Aknowledgments: This project was financially supported by Grant agency of Charles University (grant number GAUK 122309) and by SVV/2011/263002.

FLAVONOID PRODUCTION IN SCUTELLARIA BAICALENSIS BIOREACTOR CULTURE

Martin J., Kršková Z., Tůmová L.

Faculty Of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech republic

INTRODUCTION

The most commonly studied flavonoids in *Scutellaria baicalensis* Georgii include baicalin, its aglycon baicalein, wogonin and wogonoside. These compounds can serve as free radical scavengers, antioxidants as well as antihypertensive and anti-inflammatory agents, cytostatics, sedatives, anticoagulants, antialergens. The production of these secondary metabolites using plant tissue cultures has been suggested as a feasible technology. In plant cell culture, considerable effort has been directed toward the improvement of flavonoid biosynthesis for achieving an economically viable process for commercial applications.

OBJECTIVES

The objective of this experimental work was to investigate the applicability of suspension culture conditions to bioreactor cultivation. Previously reported effects of phytohormones (kinetin, BAP, NAA and 2,4-D), irradiation length, and precursors (cinnamic acid, cinnamic acid sodium salt) added to suspension culture growing in flasks were summarized and these results were used for cultivation in bioreactor. (1,2,3) The effects of elicitors Mg-ATP and methylene blue were also examined.

MATERIALS AND METHODS

Suspension cultures of *S. baicalensis* growing in flasks were derived from callus cultures five years ago and were continuously cultivated on Murashige-Skoog (MS) medium with addition of α -NAA (10mg/l). These cultures were used for bioreactor inoculation.

Bioreactor cultivation: Suspension culture was cultivated in two separate bioreactor vessels (bioreactor BIOSTAT B-DCU 2 l). MS medium, 16-h light photoperiod, agitation of 150 rpm and aeration of 0.3 vvm were used. Before inoculation, the medium of the first vessel was enriched with one of examined substances mentioned lower. The sec-

ond vessel performed the control cultivation under the same conditions without tested substance.

Phytohormones: Always one of the studied phytohormones was added to culture medium of the first vessel: kinetin (in concentration of 1mg/l), BAP (2mg/l), α -NAA (10mg/l) and 2,4-D (1mg/l).

Precursors and elicitors: Always one potential precursor or elicitor was fed to culture medium: cinnamic acid (1 mg/l), sodium cinnamate (5 mg/l), MgATP (1,594 g/l), methylene blue (100 mg/l). The effect of MgATP and methylene blue in combination was investigated as well.

Dry weight determination: 50 ml samples were collected during the run and filtered under reduced pressure. The cells were washed three times with water and dried at 60°C. The dry weight was quantified gravimetrically.

Sample adjustment and analysis: Cultures were dried after three weeks of cultivation. Powdered material was extracted with 80% aqueous methanol (2 x 10 ml) for 30 min. Chlorophyll and lipids were eliminated by liquid - liquid extraction with petroleum ether. Samples were analyzed by HPLC and content of two main flavonoids baicalin and baicalein was determined.

RESULTS AND CONCLUSIONS

The effect of phytohormones: Addition of α -NAA (10mg/l) has the highest positive effect on the growth and flavonoid content. On the other side, BAP and kinetin decelerate growth and decrease the flavonoid content. Results correspond with those for flask suspension cultures. (4) The effect of precursors and elicitors: Flavonoid biosynthesis was stimulated by the addition of sodium cinnamate, but not so much like in suspension cultures growing in flasks. (2) The final biomass of 6 g/l and the flavonoid production of 0.075 g/l were achieved.

Methylene blue caused an increase in the content of baicalin and proved to be a suitable elicitor for *S. baicalensis* bioreactor cultures. The flavonoid content was 2 times higher than in the control culture. MgATP and the combination of MgATP and methylene blue did not cause any significant improvement in flavonoid production. It was probably due to lower stability of MgATP during the long term cultivation in bioreactor.

Aknowledgments: The research was supported by Research project MSM 0021620822 and SVV-2010-261-002 grant.

REFERENCES

1. Jimenez V.M., Bangerth F.: Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis in vitro. *Plant Science* 160 (2001), 247-257.
2. Martin J., Dušek J.: Flavonoid accumulation in *Scutellaria baicalensis* Georgii in vitro cultures upon treatment with sodium cinnamate. *Čes. Slov. Farm.* 56 (2007), 280-283.
3. Kršková Z., et al.: Effects of Mg-ATP on the flavonoid production in the *Scutellaria baicalensis* Georgii suspension cultures, *Čes. Slov. Farm.* 57 (2008), 111-114.
4. Martin J., et al.: Effect of phytohormones on *Scutellaria baicalensis* callus cultures, Joint Meeting of the Austrian, Czech and German Pharmaceutical Societies, 2004, Regensburg, Germany, Congress bulletin P B16.

COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *HERACLEUM VERTICILLATUM* ESSENTIAL OILS

Silvana Petrović¹, Milica Pavlović-Drobac¹,
Marina Milenković², Marjan Niketić³

¹Department of Pharmacognosy, ²Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, V. Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia,

³Natural History Museum, Njegoševa 51, 11000 Belgrade, Serbia

The genus *Heracleum* L. (Umbelliferae) comprises about 125 species¹ predominantly distributed in the temperate Northern Hemisphere and six of them occur in the flora of Serbia^{2,3}. Endemic species *Heracleum verticillatum* Pančić is a biennial herbaceous plant with a basal rosette and the whorled upper branches. It differs from close related *H. sphondylium* L. by having softly pubescent to villous young branches². The species is restricted to silicious mountain massives in Central Balkan (E. Serbia, W. and S. Bulgaria, N.E. Greece) and its natural populations inhabit wet places along the springs in subalpine zone.

Roots, herbs (leaves and flowers), and fruits of *H. verticillatum* were collected in June 2010 on Mt Stara planina (E. Serbia). Air-dried, powdered plant material was hydrodistilled according to the procedure of the European Pharmacopoeia 6.0, using *n*-hexane as a collecting solvent. Composition of isolated essential oils was analyzed by GC and GC-MS. The antimicrobial activity was tested using the microdilution method⁴ against standard Gram (+) bacteria (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*), Gram (-) bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*), and two strains of yeast *Candida albicans*. Roots yielded 0.36% (w/w) of essential oil (sample 1), herbs (leaves and flowers) yielded 0.17% (w/w) of essential oil (sample 2), and fruits yielded 1.44% (w/w) of essential oil (sample 3). The main compounds of root essential oil were β -pinene (34.3%), limonene (24.8%) and an oxygenated sesquiterpene intermedeol (12.8%). In the herb essential oil the most dominant were (E)-caryophyllene (18.5%), γ -palmitolactone (18.4%) and hexadecanoic acid (11.7%). The essential oil from fruits was mainly composed of aliphatic esters (88.1%) and among them the most dominant were octyl 2-methyl butanoate (38.3%), octyl acetate (17.7%) and octyl isobutyrate (15.5%).

Essential oils from the roots and herbs exhibited activity against both strains of *Candida albicans* 10259 and 10231 (MICs 131.00 and 32.75 μ g/ml for sample 1, and 133.00 and 16.62 μ g/ml for sample 2) and against *Micrococcus luteus* (MICs 32.75 and 33.25 μ g/ml for sample 1 and sample 2, respectively). Herb essential oil was also active against *Bacillus subtilis* (MIC 66.50 μ g/ml). Samples 1 and 2 were not active against other tested microorganisms (MICs > 262.00 μ g/ml), as well as sample 3 (fruit essential oil) against all tested microorganisms (MICs > 242.50 μ g/ml).

REFERENCES

1. Pimenov, M. G., Leonov, M. V. (2004): The Asian Umbelliferae Biodiversity Database (ASIUM) with Particular Reference to South-West Asian Taxa. Turkish Journal of botany 28: 139-145.
2. Nikolić, V. (1973): Apiaceae Lindley. In: Josifović, M. (ed.): Flora SR Srbije 5: 183-349.
3. Stevanović, V. (1986): *Heracleum orphanidis* Boiss. In: Sarić, M., Diklić, N. (eds.): Flora SR Srbije 10: 152.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 15th informational supplement. CLSI document M100-S15. Wayne, PA, USA; 2005.

ESSENTIAL OIL OF *SESELI RIGIDUM* ROOT

Mirjana Marčetić¹,
Branislava Lakušić², Nada Kovačević¹

¹Department of Pharmacognosy, ²Department of Botany, Faculty of Pharmacy University of Belgrade, V. Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia
Seseli rigidum W. K., Apiaceae is herbaceous perennial plant native to Balkan Peninsula. It contains essential oil in all plant organs, especially in aerial parts [1]. Dominant compounds of essential oil of aerial parts are α -pinene (53.3%), limonene (10.0%), germacrene D (9.3%) and myrcene (6.0%) [2], while α -pinene (48.5%), camphene (4.6%), β -pinene (4.2%) and limonene (4.1%) are major constituents of flower essential oil [3]. The aim of this study was to determine the composition of essential oil of underground parts of *S. rigidum* which was not previously investigated. Plant material was collected from two localities in Serbia, Brdjanska gorge from serpentine soil and Moravica from calcareous soil. Essential oil was obtained by hydrodistillation from dried, comminuted roots of *S. rigidum*. GC and GC/MS were applied for analysis of essential oil composition [4].

28 components were identified in essential oil from Brdjanska gorge and 32 in oil from Moravica, representing 93.9% and 94.9% of the total oil, respectively. In both samples saturated and unsaturated hydrocarbons were the most dominant compounds (80.9-90.4%). Polyacetylene falcariol was major constituent, representing 76.9% in oil from Moravica and 89.0% in oil from Brdjanska gorge. Falcariol occurs in common food plants of family Apiaceae, such as carrot, celery and parsley. It demonstrates antibacterial, anti-inflammatory, anti-aggregatory and cytotoxic activity [5, 6].

Serpentine soil is usually characterized by low calcium to magnesium ratio and lack of essential nutrients such as nitrogen, potassium and phosphorus [7]. Essential oil from sample from serpentine soil contained higher content of hydrocarbons and lower amount of monoterpene hydrocarbons (0.2%) and sesquiterpenes (1.0%) than oil from sample from calcareous soil (4.0% and 7.6%, respectively). In essential oil from calcareous terrain monoterpenes α -pinene, limonene, myrcene, camphene and sesquiterpenes α -gurjunene and E-caryophyllene were present in larger amounts. β -sesquiphellandrene, germacrene D and germacrene B were absent from serpentine soil essential oil sample. Essential oil from *S. rigidum* root contained polyacetylene falcariol as major compound. Differences in essential oil composition from serpentine and calcareous soil can be observed in higher saturated and unsaturated hydrocarbons content in oil from serpentine soil and larger amount of monoterpenes and sesquiterpenes in oil from calcareous soil.

REFERENCES

- Kuznjecova G. A., Ševarda A. L., Pavlović S., Jančić R. (1982) Količina i kvalitativni sastav etarskog ulja raznih biljnih delova devesilja - *Seseli rigidum* Waldst et Kit. iz klisura reka Grze, Jerme i Despotovice. Arhiv za farmaciju 5: 291-299.
- Šavikin-Fodulović K. P., Zdunić G. M., Tasić S. R. (2006) Essential oil of *Seseli rigidum* Walst et Kit. var. *rigidum*. Journal of Essential Oil Research, 18 (2): 156-157.
- Stojković S., Petrović S., Kukic J., Dzamic A., Ristic M., Milenkovic M., Glamoclija J., Sokovic M., Stojkovic D. (2009) Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of *Seseli rigidum* flower essential oil. Chemistry of Natural Compounds 45(2): 253-256.
- Adams R. P. (2001) Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinois.
- Leonti M., Casu L., Raduner S., Cottiglia F., Floris C., Altmann K. H., Gertsch J. (2010) Falcariol is a covalent cannabinoid CB1 receptor antagonist and induces pro-allergic effects in skin. Biochemical pharmacology 79 (12): 1815-1826.
- Christensen L. P. (2011) Aliphatic C (17)-polyacetylenes of the falcariol type as a potential health promoting compounds in food plants of the Apiaceae family. Recent Patents on Food Nutrition & Agriculture 3 (1): 64-77.
- Chiarucci A., Baker A. J. M. (2007) Advances in the ecology of serpentine soils. Plant Soil 293: 1-2.

ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM SOME *CARDUUS* SPECIES

Dimitrina Zheleva-Dimitrova¹, Iliya Zhelev²,
Gerassim Kitanov², Ivanka Dimitrova-Dyulgerova³

¹Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medical University Sofia, Dunav str.2, 1000 Sofia, Bulgaria,

²Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Plovdiv, Plovdiv, Bulgaria,

³Department of Botany, Faculty of Biology, Plovdiv University "Paisii Hilendarski", Plovdiv, Bulgaria

There is an increasing interest in antioxidants, particularly in those intended to prevent the presumed deleterious effects of free radicals in the human body, and to prevent the deterioration of fats and other constituents of foodstuffs. In both cases, there is a preference for antioxidants from natural rather than from synthetic sources (1). In order to discover new antioxidant principles we evaluated the radical scavenging activity and inhibition of lipid peroxidation of extracts from seven *Carduus* species: *Carduus acanthoides* L., *C. acicularis* Bertol., *C. crispus* L., *C. candicans* Waldst. & Kit. ssp. *globifer* (Vel.) Kazmi, *C. nutans* L., *C. kernerii* Simonkai ssp. *austro-orientalis*, *C. thomermerii* Weinm.

These species are members of the family Asteraceae, tribe Cynareae and are commonly known as thistles (2). In previous phytochemical studies the presence of flavonoids, lignans, pentacyclic triterpenoids, isoquinoline alkaloids, phenolic acids, sesquiterpene lactones, phenylpropanoids, and saturated fatty acids has been established (2-7). No reports on the antilipoxygenase and antioxidant activities of studied species are presently available.

Radical scavenging and antioxidant activity of aquatic and ethanol extracts from *Carduus* species were examined using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (8) and 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) di-ammonium salt (ABTS) (9) free radicals; ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay (10) and inhibition of lipid peroxidation in linoleic acid system by the ferric thiocyanate method (FTC) (11). Butylated hydroxytoluene (BHT) and ascorbic acid were used as positive controls. In addition, the quantification of tannins and flavanoids were determinate using Folin-Chiocalteu reagent and AlCl₃, respectively (12). The amount of tannins was expressed as pyrogallol equivalent (PE) g/100 dry weight (dw), the total flavonoid content was expressed as g quercetin equivalent (QE) g/100 g dw. All tested extracts demonstrate significant radical scavenging, antioxidant activity and some of them strongly inhibit lipid peroxidation compared to the control.

These plants, rich in flavonoids and other phenolic compounds could be a good source of natural antioxidants. Therefore this investigation could be helpful for completing knowledge about pharmacological activity of genera *Carduus*.

REFERENCES:

1. Abdalla, A.E. and Roozen, J.P. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion, *Food Chemistry*, 64, 1999, 323-329.
2. Madrigal, R., Plattner, R. and Smith, Jr., C. *Carduus nigrescens* seed oil-rich source of pentacyclic triterpenoids. *Lipids*, 10, 1975, 208-213.
3. Fernández, I., García, B., Pedro, J. Lignans and flavonoids from *Carduus assoi*. *Phytochemistry*, 30, 1992, 1030-1032.
4. Kaloshina, N., Mazulin, A. Flavonoids from *Carduus nutans*. *Chemistry of natural compounds*, 24, 1988, 389.
5. Jordon-Thaden, I., Louda, S. Chemistry of *Cirsium* and *Carduus*: A role in ecological risk assessment for biological control of weeds? *Biochemical*

Systematics and Ecology, 31, 2003, 1353-1396.

6. Orhan, I., Deliorman-Orhan, D., Özçelik, B. Antiviral activity and cytotoxicity of the lipophilic extracts of various edible plants and their fatty acids. *Food chemistry*, 115, 2009, 701-705.

7. Xie, W., Jia, Zh. Two new isoquinoline alkaloids from *Carduus crispus*. *Chinese Chemical Letters*, 9, 2004, 1057-1059.

8. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 1958, 181, 1199-1200.

9. Arnao, M., Cano, A., Acosta, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 2001, 73, 239-244.

10. Benzie, I., Strain, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239, 70-76.

11. Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A., Sakata, K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1994, 58, 1780-1783.

12. European Pharmacopoeia. Council of Europe (COE) – European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Strasbourg: Council of Europe; 2005.

EX-SITU COLLECTIONS OF ENDANGERED MEDICINAL PLANTS

Vessela Balabanova¹, Antonina Vitkova²,
Ekaterina Kozuharova¹

¹Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medicinal University-Sofia, 2 Dunav str., 1000 Sofia, Bulgaria

²Department of Plant and Fungal Diversity and Resources, Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of Science, Acad. G. Bonchev str., bl. 23, 1113 Sofia, Bulgaria

Pre-exploitation of the natural resources leads to their decrease. Nowadays it is a great challenge to find a way to maintain and use sustainably the source of medicinal plants. Ex-situ collections of *Arnica montana* L. (Asteraceae) and *Gypsophila trichotoma* Wend. (Caryophyllaceae) were established in Bulgaria. These two species are valuable medicinal plants, but their populations are decreasing in the native habitats due to destruction of the areal and over-harvesting for medicinal purpose. *Arnica* is protected in many European countries since the species in some countries is endangered, and in another is vulnerable [1,2,3,4]. *Gypsophila trichotoma* is protected by the Bulgarian Biodiversity Law and its IUCN category is assessed as endangered (EN) [5,6]. Studying the specific features of plant ontogenetic development is an important circumstance for its successful protection and cultivation.

The biological and morphological characteristics of these two plants were followed up. The seed germination was investigated [7, 8]. Phenological observations and biometrical measurements were carried out for each stage of development [9].

The results show that capacity of germination of *Arnica montana* was highest under laboratory conditions. The seedlings were adapted under greenhouse conditions and then placed in the experimental plot. The plants grew slowly in the aerial part in their first vegetation season, but they intensely developed the rhizome being perennial plant. Most plants overwintered and came into generative period during the second year. The main flowering stage had duration about three-four weeks (June-July). The records for *Gypsophila trichotoma* show that the seeds germinated well in some degree but then many of the seedlings did not survive their early stages of development; once planted in the experimental plot, they developed well. Few plants came into generative period during the first year of ontogenesis. The blossoming rhythm started in the middle summer and ended at the beginning of autumn (August-October/November).

Both species adapted successfully to their new habitat and conditions and kept growing quite well during the following years preserving the main specific characteristics of their life form.

REFERENCES

- [1] WWF Germany/TRAFFIC Europe-Germany. *Arnica montana – Faktenblatt*. WWF Germany, Frankfurt am Main. 2001.
- [2] Lange, D. Europe's medicinal and aromatic plants: their use, trade and conservation. TRAFFIC International, Cambridge, UK, 1998, 1-77.
- [3] Kathe, W. Conservation of Eastern – European Medicinal Plants. *Arnica montana in Romania*. In: R. J. Boger et al. (eds.), *Medicinal and Aromatic Plants*. Springer, Printed in Netherland, 2006, 203-211.
- [4] Ellenberger, A. Assuming responsibility for protected plant: WELEDA's endeavour to secure the firm's supply of *Arnica montana*. In: *Proceedings of the First International Symposium on the Conservation of Medicinal Plants in Trade in Europe*. 22-23 June, Royal Botanic gardens, Kew, UK, 1998, 127-130.
- [5] State Gazette. The law for the biological diversity, 77, 09.08.2002.
- [6] Kovachev I. *Gypsophila trichotoma* Wend. In: *Red data book of NR Bulgaria*. Plants. (eds Velchev . et al.), Sofia, BAS Press. 1, 1984, 98.
- [7] Firsova, M. K. *Methods of determination seeds quality*. Moscow, "Kolos". 1969, 352.
- [8] Ovcharov, K. E. *Physiology of formation and seed germination*. Moscow, "Kolos", 1976, 25.
- [9] Beideman, N. *Methods of studying plant phenology and plant communities*, Novosibirsk, "Nauka", 1974, 5-39.

STUDY OF PLANT EXTRACTS ACTIVITY ON DIFFERENT CELL LINES

S. Kellici¹, B. Jucja¹, V. Toska¹, B. Basha¹, E. Balestrieri², R. Sorrentino², E. Troja¹, E. Hoti¹, P. Sinibaldi Vallebona²

¹University of Tirana, Faculty of Medicine, Pharmaceutical Department

²University Tor Vergata, Rome, Department of biochemical sciences and experimental medicine

INTRODUCTION

Sambuci Flos and *Betulae Folium* are two plants growing wild in Albania and traditionally used for the treatment of flu symptoms, common cold, (*Sambuci Flos*) for diuretic properties, in bacterial inflammatory diseases associated with spastic phenomena (*Betulae Folium*) ecc.

It is known that at least part of the efficacy of these plants derives from the content of flavonoid compounds.

OBJECTIVES

The objective of our research was to investigate if these plants (their flavonoid components) can have any activity on human melanoma cells (TVM-A12 and M14).

METHODS

We received extracts of flavonoid compounds for these two plants by using acetone and ethyl acetate for the extraction. We used the *Helvetica* pharmacopoeia and we evaluated the presence of flavonoid compounds through spectroscopic methods.

We found a 0.6% quantity of flavonoids in *Sambuci Flos* and 0.7% flavonoid content for *Betulae Folium*.

These extracts were further used to determine their activity on human melanoma cells (TVM-A12 and M14).

It was investigated the ability of these extracts to influence the cell proliferation. The cells were suspended in RPMI 1640 completed with 10% foetal calf serum (FCS) at a density of 5×10^5 /ml and distributed at 100µl/well on piastre of 96 wells. The extracts were added as a series

of dilutions (1/4; 1/8; 1/20; 1/50; 1/100) and putted in incubation at 37°C for 72 hours. In the last 18 hours it was added Triziate-Thymidine as 1µCi/well.

At the same experimental conditions we used these cell lines to evaluate the influence on cellular metabolism through colorimetric methods (MTS assay) using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-salt as reagent which is added at the end of the incubation as 10µl/well. This salt is bio-reduced by the cells and its release at the culture is measured at photometer at 490nm.

The 1/10 dilution that resulted the most efficient and free of toxicity was used to evaluate the eventual protective activity of these extracts against apoptotic events induced by H₂O₂. To realize this evaluation: cells were incubated overnight, was added H₂O₂ at different concentrations for further 24 hours and than the cells marked for the evaluation at flow cytofluorometry. For each sample were collected and evaluated at least 5000 events, through CellQuest (BD Bioscience) software.

RESULTS

Both plant extracts didn't show any toxicity and thus there is not any evidence for antiproliferative efficacy.

Both plants extracts didn't show any cytotoxic activity on these cell lines.

These two preliminary experiments helped us to identify the appropriate dilutions to be further investigated on their ability to induce and/or enhance apoptosis events.

After evaluation at cytofluorometry it was shown that there is a relative efficacy on the enhancement of the cellular apoptosis induced by H₂O₂ when plant extracts are added to the cell cultures prior to H₂O₂.

CONCLUSIONS

There is space to investigate on the eventual possibility of these plant compounds to interfere on the cellular apoptosis. Indeed this is only small evidence that should be further elaborated.

REFERENCES

- Bradley P.; A handbook of scientific information on widely used plant drugs. Bournemouth; British Herbal compendium, Vol.2; British Herbal medicine Association; 2006.
- Fecher L.A., Cummings C.D., Keefe M.J., Alani R.M.; Toward a molecular classification of melanoma; *Journal of Clinical Oncology* 25, 1606-1620; 2007.
- Melino G., Sinibaldi Vallebona P., D'Altri S., Annichiarico-Petruzzelli M., Rasi G., Catani M.V., Tartaglia R.L., Vernole P., Spagnoli L.G., Finazzi-Agro A., Garaci E.; Characterization of three melanoma cell lines (TVM-A12, TVM A-197, TVM-BO) sensitivity to lysis and effect of retinoic acid; *Clin. Chem. Enzymol. Commun.* 6; 105-119; 1993.
- Alan R. Clarke, Nathalie Sphyrin, David J. Harrison, MRCPATH; Apoptosis in vivo and in vitro: conflict or complementarity? *Molecular Medicine Today*, 2, 189-191; 1996.
- A.Serafino et al.; Differentiation of human melanoma cells induced by cyanidin-3-o-β-glucopyranoside; *FASEB Journal*, 18, 1940-1942; 2004.

COMPOSITION OF THE ESSENTIAL OILS OF *ARTEMISIA ALBA TURRA*

Dragana Stanisavljević¹, Mihailo Ristić², Sofija Dorđević², Dragan Veličković¹, Novica Randelović³

¹College of Agriculture and Food Technology, Ćirila and Metodija 1, 18400 Prokuplje

²Institute for Medicinal Plant Research "Dr Josif Pančić", Tadeuša Koščuška 1, 11000 Belgrade

³University of Niš, Faculty of Sciences and Mathematics, Department of Biology and Ecology, Višegradska 33, 18000 Niš, Serbia

Plants belonging to the family Asteraceae typically are aromatic plants containing appreciable amounts of essential oils. The genus *Artemisia*, with up to 500 species, is one of the largest and most widely distributed in the tribe Anthemideae. In ancient Greece and in the Roman Empire the essential oil from the *Artemisia* species was used as poison antidote and to elevate gastric insufficiency. It also affect to the blood circulation and has anti-malaric and anti-helminic properties (1, 2). Some of these essential oils have found uses in perfumery and medicine (3, 4, 5). *Artemisia* species are reported to possess anti-diabetic effect and have been used in many countries of middle east and Iran as a herbal medicine for treatment of diabetes, high blood pressure, anti-migraine, anti-bacterial, anti-fungal, anti-helminic, digestive, mycolytic, stomachic, lipolytic activity (6, 7, 8, 9, 10). Because of application of *Artemisia* in traditional medicine, many species of this genus have been surveyed by phytochemists and pharmacologists (11, 12, 13). One of the important species is *Artemisia alba Turra* (syn. *A. camphorata*) (14).

The aim of our this study is to compare the content and chemical composition of essential oils obtained from fresh and dried herb of this plant species, to determine whether there is a significant difference in the quality of herbal raw materials.

Plant material was collected in the flowering stage in September 2009 from the municipality of Knjaževac. Plants were collected in the morning hours, in dry place and dried 15 days in the shade of a draughty place.

Isolation of the essential oil from fresh and dried herb of *A. alba* was carried out by steam distillation in the Clevenger type apparatus, according to procedure Ph. Jug. IV (15). The oil was yellow with the odor characteristic of that plant. Qualitative and quantitative analysis of essential oil was conducted by GC-FID and GC-MS methods.

GC-FID analysis of the oils was carried out on a HP-5890 Series II GC apparatus, equipped with split-splitless injector and automatic liquid sampler (ALS), attached to HP-5 column (25 m × 0.32 mm, 0.52 μm film thickness). Split ratio 1:30, injector temperature 250°C, detector temperature 300°C, while column temperature was linearly programmed from 40-260°C (4°/min). Solutions of essential oils (1% in ethanol) were consecutively injected by ALS (1 μl). Area percent reports, obtained as result of standard processing of chromatograms, were used as base for the quantification purposes. The same analytical conditions as those mentioned for GC-FID were employed for GC-MS analysis, along with column HP-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm film thickness), using HP G 1800C Series II GCD system. Transfer line was heated at 260°C. Mass spectra were acquired in EI mode (70 eV), in m/z range 40-450. Solutions of the essential oils (1% in ethanol) were injected by ALS (200 μl). The constituents were identified by comparison of their mass spectra to those from Wiley275 and

NIST/NBS libraries, using different search engines. The experimental values for retention indices were determined by the use of calibrated Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System software (AMDIS), compared to those from available literature (16), and used as additional tool to approve MS findings.

The contents of the essential oil of the fresh and naturally dried herb were different. The largest quantity has been obtained from the dry herb (0.5%), while it has been around (0.2%) in the case of the fresh herb. Chemical composition of essential oils is also variable.

Thirty components were identified in the essential oil obtained from fresh *A. alba*. Content of dominant component camphor was 24.7%, along with α-bisabolol 19.4%, 1,8-cineole 9.8%, artemisia ketone 7.9%, γ-murolene 4.5%, α-murolol (torreyol) 3.9%, pinocarvone 3.0% and trans-chrysanthenol 2.7%.

In the essential oil obtained from the naturally dried herb twenty eight components were identified. Content of camphor was 23.7%, α-bisabolol 6.1%, 1,8-cineole 14.1%, artemisia ketone 15.2%, γ-murolene 0.6%, pinocarvone 1.6% and trans-chrysanthenol 8.6%. Camphor was the major constituent in both oils in approximately the same concentration (~25%). Fresh herb oil contained significantly higher content of α-bisabolol (19.4%) in comparison to that originating from the dried plant material (6.1%). Content of artemisia ketone in dried herb oil (15.2%) was two times higher to that from fresh herb oil (7.9%). The oil from the fresh herb contained also smaller quantities of 1,8-cineole (9.8%) in comparison to that obtained from the dried herb (14.1%).

Along with geographic origin, temperature, the way and duration of drying, also affects the composition of the essential (17).

Constituents such as camphor, 1,8-cineole and artemisia ketone are typical for oils of several different *Artemisia* species, including tested oil of *A. alba*.

Our results show that both fresh and dried herb *A. alba Turra* could be used as a high-quality raw materials for the isolation of essential oils.

REFERENCES

- Bhakuni R.S., Jain D.C., Sharma R.P., Kumar S. (2001) *Current Sci.*, 80, 35-48.
- Fesen M.R., Pommier Y., Leteurre F., Heroguchi S., Yang J., Kohn K.W. (1994) *Biochem. Pharmacol.*, 48, 595-608.
- Kim K S, Lee S, Hung S H, Park Y and Shin K H, *J. Ethnopharmacology*, 2003, 85, 69.
- Marrif B H and Hassan A K M, *J. Ethnopharmacology*, 1995, 49, 51.
- Mueller M S, Karhayomba I B, Hirt H M and Wemakor E, *J. Ethnopharmacology*, 2000, 73, 487.
- Gundidza M, *J. Fitoterapia.*, 1986, 57,111.
- Mabberly D J, *The Plant book*, Cambridge University Press, 1993.
- Rustaiyan A, Ameri N, Mirjalili B F, Mazloum Ardakani M, Hakimi. Maybody M and Bamoniri, *Am. J. Sci.* 2003, 48, 1074.
- Sheppard Hanger S, *The Aromatherapy Practitioner Reference Manual*, 1995.
- Thakur R S, Misra, L N, *Essential oils of India artemisia 11th Int. congress of essential oils fragrances and flavours*, New Delhi, 1989.
- Graven E, Deans S, Mavi S, Gudidza M G and Svoboda K P, *Flavour and Fragrance J.* 1992, 7, 121.
- Mc Gaw L J, Lager A K and Van Staden J V, *J. Ethnopharmacology*, 2000, 72, 247.
- Salah S M and Jager A K, *J. Ethnopharmacology*, 2005, 99, 145.
- Tutin, T. G. (Ed.): *Flora Europaea*, Vol 4, Cambridge University Press, Cambridge, 180, 1976.
- Pharmacopea Jugoslavica, editio quarta (Ph. Jug. IV), Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu, Beograd, 1984.
- Adams, R. 2007: *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th Ed., Allured Publishing Corp., Carol Stream, IL 60188 USA.
- Khangholi S. and Rezaeinodehi A. (2008) *Pakistan J.Biol. Sci.*, 11, 934-937.

DIFFERENT METHODS OF EXTRACTING CAPSAICIN FROM ALBANIAN'S CAPSICUM FRUITS

Enkelejda Goci¹, Ledjan Malaj², Rezarta Shkreli¹

¹

Department of Pharmacy, Faculty of Medical Science, Kristal University, Tirana, Albania.

²Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Tirana, Tirana, Albania.

The fruits of Capsicum are used worldwide as food additive and in traditional medicine. The pungent components responsible for the medical uses are the alkaloids called capsaicinoids. Capsaicin (trans 8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) is a major pungent lipophilic alkaloid of Capsicum fruits. Dermatological ointments of capsaicin are used for therapeutic purposes to treat peripheral painful diseases, like: rheumatoid arthritis, diabetic neuropathy, muscle pain, etc. Especially compelling are the promising results of medical studies showing possible beneficial effects in many diseases. Isolation of capsaicin from Capsicum fruits was described by many authors with different methods of extraction. Generally extracted directly from fruit has made necessary the using of established methods to increase production through extraction. Over time these methods have improved, usually by applying existing techniques with some important changes. The most used methods are maceration, Soxhlet extraction, supercritical fluid extraction (CO₂) and ultrasound. The aim of this study is to define and to optimize the efficacy of these extracting methods applied to Albanian's Capsicum fruits.

In this work are applied three methods of extracting capsaicin from whole pepper with organic solvents: maceration, Soxhlet and ultrasound extraction. Maceration process undergoes with three solvents: ethanol 95% for 24 hours; acetone for 2 h; ethyl acetate for 24h. The Soxhlet extraction is realized with two solvents: ethanol 95% and acetone. The third process of extraction is done by using ultrasonic bath with two organic solvents: methanol for 20 minutes and acetonitril for 1 hour (3 x 20').

Thin layer chromatography (TLC) is used to identify the presence of capsaicin on ground dried red pepper obtained from local markets in Fier, Albania.

Extraction and qualitative determination was carried-out in duplicate for each method.

The extraction of capsaicin by using organic solvent extraction methods is useful and efficient. The most easy and appropriate methods are maceration and ultrasound extraction. These methods are not time consuming and also not much solvents are used. The performance of the processes is depending by the extraction method and the solvent. Also the selectivity between all the methods is done relying in toxicity of the solvents.

In conclusion, all the three methods give good results in the extraction of capsaicin.

The thin layer chromatography analysis confirms the presence of this compound in the Capsicum fruits.

REFERENCES:

- Sanatombi K., Sharma G.J., 2008, Capsaicin content and pungency of different capsicum spp. Cultivars. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj 36 (2), 89-90.
Singh S., Jarret R., Russo V., Majetic G., Shimkus J., Bushway R., Perkins B., 2009, Determination of capsinoids by Hplc-Dad in capsicum species. J. Agric. Food Chem. 57, 3452 - 3457.

- Korel F., Bagdatlioglu N., Balaban M., Hisil Y., 2002, Ground red peppers: Capsaicinoids content, Scoville scores and discrimination by an electronic nose. J. Agric. Food Chem. 50, 3257 - 3261.
Chen D., Wu Z., 2009, Study on extraction and purification process of capsicum red pigment. Journal of Agricultural Science 1(2).
Soetarno S., Sukrasno, Yulimah E. and Sylvia, 1997, Antimicrobial activities of the ethanol extracts of capsicum fruits with different levels of pungency. JMS Vol. 2 No. 2, hal. 57-63.
Farmacopea ufficiale della repubblica italiana - Droghe vegetali e preparazioni, Roma 1991, 100-105.
Nwokem C.O., Agbaji E. B., Kagbu J.A., Ekanem E. J., 2010, Determination of Capsaicin Content and Pungency Level of Five Different Peppers Grown in Nigeria. New York Science Journal 3 (9), 17-21.
Reyes-Escogido M., Gonzalez-Mondragon E. G. and Vazquez-Tzompantzi E., 2011, Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin. Molecules 16, 1253-1270.
Garceas-Claver A., Arnedo-Andres M. S., Abadia J., Gil-Ortega R., and Alvarez-Fernandez A., 2006, Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Capsicum Fruits by Liquid Chromatography-Electrospray/Time-of-Flight Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. 54, 9303-9311

TRITERPENOID SAPONINS FROM THE ROOTS AND IN VITRO ROOT CULTURES OF GYPSOPHILA SPECIES

Reneta Gevrenova

Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medical University-Sofia, Bulgaria

Roots from *Gypsophila* species are an especially rich source of triterpene saponins (1). They are exploited commercially for a variety of purposes including medicines, detergents, adjuvants and cosmetics. A large number of the *Gypsophila* mono- and bidesmosides have been isolated and characterized (2-4). Excised root cultures of *G. paniculata* have been described and the existence of saponins in them has been reported (5). The aim of our study was to compare the accumulation of triterpene saponins, with focus on a prosapogenin gypsogenin 3-O-glucuronide, in roots and excised root *in vitro* cultures of *Gypsophila* species.

Excised root cultures from six *Gypsophila* species (*G. paniculata*, *G. trichotoma*, *C. glomerata*, *G. elegans*, *G. scorzonifolia* and *G. viscosa*) was performed allowing continuous growth without phytohormones (6). Established on MH₃ medium (5) from solid-grown seedlings these roots were subcultured for one year on solid medium before any transfer in liquid medium to obtain substantial biomass for saponin content analysis. Saponins were extracted from the *in vitro* and *in vivo* roots by sonification. After a mild acid hydrolysis of the extracts (7), the prosapogenin gypsogenin 3-O-glucuronide was isolated by SPE and determined by UPLC/ESI/MS. The quantitative determination of the prosapogenin was performed by RP-HPLC using a mobile phase consisting of acetonitril and phosphoric acid (0.1%).

The saponin content in the roots of intact plants *G. paniculata* and *G. trichotoma* was compared with that of Saponin White (Merck). In addition, the prosapogenin quillaic acid 3-O-glucuronide was determined. The quantitative determination of the prosapogenin revealed between 7.5 and 9 mg/g dry weigh in the roots of *Gypsophila* species. The maximum content was recorded for Saponin White giving values of 166 mg/g which represent 22-fold more compared with *G. paniculata*. The relative ration of the two prosapogenins in the roots of *G. paniculata* was 71.4% of gypsogenin 3-O-glucuronide and 19.6% of quillaic acid 3-O-glucuronide. Significant growth for *in vitro* root cultures of *G. glomerata* was achieved within 3 weeks on liquid medium; biomass grew up to 50-fold in batch cultures reaching 10 g

DW (average dry biomass 5.68±4.08 per explant). The root dry weight recorded in *G. elegans* was 0.92±0.54 g. The growth was similar for *G. scorzonrifolia* and *G. paniculata*; the dry weight reached 0.29 g and 0.34 g per explant, respectively. Minimum growth was observed in *G. trichotoma* cultures. Generally, the dry weights were 2.9–5.9% of the fresh weights, which closely paralleled the fresh weights responses. The fingerprints of the saponin HPLC profiles of the root *in vitro* *Gypsophila* cultures were drastically different with at least up to 30 different saponins detected for some of them. The roots of *G. elegans* accumulated saponins (expressed as gypsogenin 3-*O*-glucuronide) up to 65 mg/g DW (mean value 31.36±31.83 mg/g DW). These amounts were higher than in *G. paniculata* and *G. trichotoma* roots found in this study and as the best producing ones (30.2–40 mg/g). The cell lines of *G. glomerata* showed a smaller quantitative amount of saponins (between 1.3 and 7.10 mg/g DW) than those of *G. elegans* but nearly the same HPLC profiles as for root extracts of intact *G. paniculata*. The other species showed a smaller production of saponins after 3 months of subculture. However, individual lines (each line cultures representing one phenotype) of *G. scorzonrifolia*, *G. paniculata* and *G. trichotoma* showed variation in gypsogenin 3-*O*-glucuronide content: in some cases the levels were below LD or LQ. Generally, the content of gypsogenin 3-*O*-glucuronide was not related to the growth rate of the cultures: the maximum average content recorded in *G. elegans* cultures in liquid medium represented 8-fold increase compared with that found in *G. glomerata*, but the mean dry biomass was 6 times lower.

In conclusion, the biosynthetic behavior of *Gypsophila* species assayed was different but we found gypsogenin saponins in all excised root cultures which prove that *in vitro* root culture can contribute in producing saponins from *Gypsophila*. It could be suggested that selection of cell lines of *G. elegans* and *G. glomerata* may be effective for enhancing the saponin production in *Gypsophila* root cultures.

REFERENCES

1. Hostettmann K, Marston A. Saponins. In: Phillipon JD, Ayres DC, Baxter H, editors. Chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge: Cambridge University Press; 1995. p. 326–7.
2. Gevrenova R, Voutquenne-Nazabadioko, Harakat D, Prost E, Henry M. (2006) Complete ¹H and ¹³C NMR assignments of saponins from roots of *Gypsophila trichotoma* Wend. Magn Res Chem 44: 686–91.
3. Nie W, Luo JG, Kong LY. (2010) New triterpenoid saponins from the roots of *Gypsophila pacifica* Kom. Carbohydr Res 345: 68–73.
4. Yao S, Ma L, Luo J-G, Wang J-S, Kong L-Y. (2010) New Triterpenoid Saponins from the Roots of *Gypsophila paniculata* L. Helv Chim Acta 93:361–374.
5. Fulcheri C, Morard P, Henry M. (1998) Stimulation of the growth and the triterpenoid saponin accumulation of *Saponaria officinalis* cell and *Gypsophila paniculata* root suspension cultures by improvement of the mineral composition of the media. J Agric Food Chem 46:2055–61.
6. Gevrenova R, Stancheva T, Voynikov Y Laurain-Mattar D, Henry M. (2010) Root *in vitro* cultures of six *Gypsophila* species and their saponin contents. Enzyme and Microbial Technology 47: 97–104.
7. Henry M, Pauthe-Dayde D, Rochd M. (1989) Extraction and high-performance liquid chromatographic determination of gypsogenin 3-*O*-glucuronide. J Chromatogr 477:413–9.

CONTENT OF TOTAL ANTIOXIDANTS IN INFUSIONS PREPARED FROM MEDICINAL PLANTS FREQUENTLY USED IN REPUBLIC OF MACEDONIA

Tatjana Ruskovska¹, Darinka Gjorgieva¹, Marija Crcoreska², Valentina Kukovska²

¹Faculty of Medical Sciences, University "Goce Delcev" Stip

²Military Medical Center, Skopje

BACKGROUND

Free radicals are highly reactive and unstable transitional chemical compounds that have potential to damage the chemical structure and impair the function of lipids, proteins and nucleic acids. It is well known that free radicals are normally produced during the metabolic processes and that, in physiological conditions, their harmful effect over bio-molecules is disabled by the activity of endogenous (represented mainly by antioxidant enzymes) and exogenous (represented by dietary antioxidants) antioxidant barrier. In conditions of extremely high production of free radicals within the biological system and/or lack of endogenous and/or exogenous antioxidants, a state of oxidative stress occurs, which has been proven to be the basis of many chronic diseases, primarily atherosclerosis, various cancers and neurodegenerative diseases. Considering the involvement of oxidative stress in the pathogenesis of above mentioned chronic diseases, numerous trials were conducted to study the possible preventive effect of antioxidant (pro)vitamins: beta-carotene, vitamin C and E. Inconsistent and mainly negative results of these trials, as well as positive results from research on the effect of diet rich in fruits and vegetables and of green tea on chronic diseases associated with oxidative stress, favored the use of natural versus synthetic antioxidants. It is believed that one of the possible reasons for such results is that natural products, despite the known antioxidant (pro)vitamins, contain numerous other antioxidants that have strong physiological effect. It is also believed that antioxidants contained in the natural products are important both because of their individual functions and their synergistic effects in the body.

AIM OF THE STUDY: Knowing the positive effects of green tea on the prevention of some of the chronic diseases that are associated with high oxidative stress, our aim was to measure the level of total antioxidants in infusions prepared from some frequently used medicinal plants in Republic of Macedonia and to compare the obtained values with that of green tea.

MATERIAL AND METHODS

The content of total antioxidants was measured in infusions prepared from the following medicinal plants: lemon balm (*Balm leaf*), St. John's wort (*Hyperici herba*), linden (*Tiliae flos*), nettle (*Urticae folium*) and green tea (*Camellia sinensis*). Medicinal plants from Good Nature, Alkaloid Skopje, were purchased in the local market, packed in filter bags.

Infusions prepared from lemon balm, St. John's wort and nettle picked in Maleshevo Mountains were also analyzed.

Preparation of infusions: 0,5g dry plant was poured with 50mL boiling water and let stand for 15 minutes, covered.

The content of total antioxidants was measured by FRAP method, according to Benzie and Strain. The method is based on the principle

that ferric to ferrous ion reduction at low pH causes production of colored ferrous-tripyridyltriazine complex that absorbs at 593nm. Solutions of FeSO₄ with known concentrations were used as standards. The concentration of total antioxidants is expressed as mmol/L FeSO₄.

RESULTS

Results from our measurements once again confirmed the high content of total antioxidants in the infusion prepared from green tea: 25,2mmol/L. From the other studied medicinal plants, the infusion prepared from lemon balm (Good Nature, Alkaloid) had particularly high value of total antioxidants, very close to that of green tea: lemon balm – 19,2mmol/L. Total antioxidants content in the infusions prepared from other Macedonian medicinal plants under study, from Good Nature, Alkaloid, were: St. John's wort – 8,5mmol/L; linden – 6,1mmol/L; nettle – 2,9mmol/L.

Infusions prepared from lemon balm and nettle picked in Maleshevo Mountains gave similar results as commercial medicinal plants: lemon balm – 19,5mmol/L; nettle – 3,7mmol/L. Exception was the infusion prepared from St. John's wort picked in Maleshevo Mountains that had higher content of total antioxidants compared with commercial medicinal plant: St. John's wort – 12,6mmol/L.

CONCLUSION: Besides well known health effects of our frequently used medicinal plants: lemon balm, St. John's wort, linden and nettle, of particular importance is their content of total antioxidants that has potential to contribute in lowering of free radicals and improvement of oxidative status in the body.

In this context it is important to remind of our previously published data about total antioxidants level in herbal infusions suitable for unrestricted everyday use (4) that could also contribute in reducing of oxidative stress.

REFERENCES

1. Benzie, I. F. F. and Strain, J.J., (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem.* 239:70-6.
2. Dragland, S., Senoo, H., Wake, K., Holte, K. and Blomhoff, R., (2003): Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *J Nutr.* 133:1286-90.
3. Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M. and Brighenti, F., (2003): Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr.* 133:2812-19.
4. Ruskovska, T., Gjorgieva, D., Crcoreska, M. and Kukovska, V., (2011): Total antioxidants level in caffeine-free herbal infusions suitable for unrestricted everyday use. *Pharmacia.* LVIII, 5:80-1.
5. Song, F.L., Gan, R.Y., Zhang, Y., Xiao, Q., Kuang, L. and Li, H. B., (2010): Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected chinese medicinal plants. *Int J Mol Sci.* 11:2362-72.

СОДРЖИНА НА ВКУПНИ АНТИОКСИДАНСИ ВО ИНФУЗИ ПОДГОТВЕНИ ОД НЕКОИ НАЈЧЕСТО КОРИСТЕНИ ЛЕКОВИТИ РАСТЕНИЈА ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

Татјана Рушковска¹, Даринка Ѓоргиева¹, Марија Црцороска², Валентина Куковска²

¹Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип

²Воено-медицински центар, Скопје

ВОВЕД

Слободните радикали претставуваат високореактивни и нестабилни преодни хемиски компоненти кои имаат потенцијал за нарушување на хемиската структура и функцијата на липидите, протеините и нуклеинските киселини. Познато е дека слободните радикали нормално се создаваат во текот на метаболичките процеси и дека, во физиолошки услови, нивното штетно дејство врз биомолекулите е оневозможено со активноста на ендогената (претставена главно со антиоксидантните ензими) и егзогената (претставена со антиоксидансите примени со храната) антиоксидантна бариера. Во услови на особено висока продукција на слободни радикали во биолошкиот систем и/или недостиг на едогени и/или егзогени антиоксиданси, се јавува состојба на оксидативен стрес за која е докажано дека претставува основа на голем број хронични заболувања, во прв ред атеросклероза, различни карциноми и невродегенеративни заболувања. Имајќи ја предвид инволвираноста на оксидативниот стрес во патогенезата на претходно споменатите заболувања, направени беа бројни испитувања за потенцијалниот превентивен ефект на антиоксидантните (про)витамини: бета-каротен, витамин С и Е. Неконзистентните и претежно негативни резултати од ваквите студии, како и позитивните резултати од истражувањата за ефектот на исхраната богата со овошје и зеленчук и на зелениот чај врз хроничните заболувања поврзани со оксидативниот стрес, ја фаворизираат употребата на природните антиоксиданси наспроти синтетичките препарати. Се смета дека една од можните причини за ваквите резултати од истражувањата е таа што природните продукти, покрај познатите антиоксидантни (про)витамини, содржат и бројни други антиоксиданси кои имаат силно физиолошко дејство. Се смета исто така дека антиоксидансите содржани во природните продукти се значајни како поради своите поединечни функции, така и со нивното синергистичко дејство во организмот.

ЦЕЛ НА ТРУДОТ

Знаејќи за позитивните ефекти на зелениот чај во превенцијата на некои од хроничните заболувања кои се поврзани со висок оксидативен стрес, наша цел беше да го измериме нивото на вкупни антиоксиданси во инфузи подготвени од некои најчесто употребувани лековити растенија во Република Македонија и да ги споредиме добиените вредности со онаа од зелениот чај.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Содржината на вкупните антиоксиданси беше одредувана во инфузи подготвени од следните лековити растенија: маточина (Balm leaf), кантарион (*Hyperici herba*), липа (*Tiliae flos*), коприва (*Urticae folium*) и зелен чај (*Camellia sinensis*). Лековитите растенија од Good

Nature, Алкалоид Скопје, беа набавени во слободна продажба, пакувани во филтер вреќички.

Анализирани беа исто така и инфузи од маточина, кантарион и коприва подготвени од лековити растенија собрани во Малешевските Планини.

Подготовка на инфузите: 0,5g суво исситнето растение се прелива со 50mL врела вода и се остава да стои 15 минути во покриен сад, после што се процедува и се анализира.

Вкупната содржина на антиоксиданси беше одредувана со FRAP методата, според Benzie и Strain. Методата е базирана на принципот на редукција на фери- во фери-јон при ниска pH, при што се продуцира обоен фери-трипиридилтриазин комплекс кој апсорбира на 593nm. Раствори од FeSO₄ со позната концентрација беа користени како стандарди. Концентрацијата на вкупните антиоксиданси е изразена како mmol/L FeSO₄.

РЕЗУЛТАТИ

Резултатите од нашите мерења уште еднаш ја потврдија високата содржина на вкупните антиоксиданси во инфузот подготвен од зелениот чај: 25,2mmol/L. Од останатите испитувани лековити растенија, инфузот од маточина (Good Nature, Алкалоид) исто така покажа особено висока вредност на вкупни антиоксиданси, многу блиска со таа од зелениот чај: маточина – 19,2mmol/L. Содржината на вкупните антиоксиданси во инфузите подготвени од останатите испитувани македонски лековити растенија од Good Nature, Алкалоид, изнесуваше: кантарион – 8,5mmol/L; липа – 6,1mmol/L; коприва – 2,9mmol/L.

Инфузите подготвени од маточина и коприва собрани од Малешевските Планини дадоа слични резултати како и комерцијалните лековити растенија: маточина – 19,5mmol/L; коприва – 3,7mmol/L. Исклучок претставуваше инфузот подготвен од кантарион од Малешевските Планини, кој имаше нешто повисока содржина на вкупни антиоксиданси во однос на комерцијалниот: кантарион – 12,6mmol/L.

ЗАКЛУЧОК

Покрај добро познатите лековити дејства на нашите многу често користени лековити растенија: маточина, кантарион, липа и коприва, од особено значење е и нивната содржина на вкупни антиоксиданси која има потенцијал да придонесе за намалување на содржината на слободните радикали, а со тоа и за подобрување на оксидативниот статус на организмот.

Во овој контекст значајно е да се истакнат и нашите претходно објавени податоци за нивото на вкупни антиоксиданси во хербални инфузи погодни за неограничена секојдневна употреба (4), кои исто така би можеле да придонесат за намалување на оксидативниот стрес.

ЛИТЕРАТУРА

1. Benzie, I. F. F. and Strain, J.J., (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem.* 239:70-6.
2. Dragland, S., Senoo, H., Wake, K., Holte, K. and Blomhoff, R., (2003): Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *J Nutr.* 133:1286-90.
3. Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M. and Brighenti, F., (2003): Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr.* 133:2812-19.
4. Ruskovska, T., Gjorgieva, D., Crcoroska, M. and Kukovska, V., (2011): Total antioxidants level in caffeine-free herbal infusions suitable for unrestricted everyday use. *Pharmacia.* LVIII, S:80-1.
5. Song, F.L., Gan, R.Y., Zhang, Y., Xiao, Q., Kuang, L. and Li, H. B., (2010): Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected chinese medicinal plants. *Int J Mol Sci.* 11:2362-72.

VARIATIONS IN THE ESSENTIAL OIL CHARACTERISTICS OF *SATUREJA MONTANA* L.(LAMIACEAE) DEPENDING ON ENVIRONMENTAL CONDITIONS AND PHENOLOGICAL STAGE

Violeta Slavkovska¹, Mihailo Ristić²,
Branislava Lakušić¹ and D Mitar Lakušić³

¹Department of Botany, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Serbia

²Institute for Medicinal Plant Research "Dr Josif Pančić", Belgrade, Serbia

³Institute of Botany and Botanical Garden "Jevremovac", Faculty of Biology, University of Belgrade, Serbia

Satureja montana L. is a perennial semi-shrub growing wild in southern Europe, the Caucasus and northern Africa [1]. This aromatic species is frequently used as a traditional medicinal plant. With regard to the presence of phenolic compounds, *S. montana* is known to possess certain pharmacological activities [2-5]. The present study describes the content, chemical composition and compositional variations of the essential oil at different phenological stages of *Satureja montana* L. transferred from natural habitat to Belgrade. Two subspecies *S. montana* subsp. *montana* and *S. montana* subsp. *pisidica* (Wettst.) Šilić were included in the analysis.

The essential oil was obtained from the aerial parts of the plant by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography (GC/FID and GC/MS). *S. montana* subsp. *montana* exhibited the lowest oil content in the pre-flowering stage (0.5%) and the highest in the flowering stage (1.2%). With the development of fruit and seeds the oil content dropped from 0.9% to 0.6%. Plants gathered in natural habitats exhibited the same trend. The main constituent in the oil of the cultivated plants in the pre-flowering stage was thymol (48.9%), whose concentration in the remaining phenological stages varies between 2% and 3%. Linalool (50%-75.6%) was the dominant component in the oils isolated from plants in the flowering, fruiting and full fruiting stages. The concentration of linalool in oil of plants in the pre-flowering stage was only 1.1%. Thymol methyl ether was the second most important component in oil of cultivated plants in the pre-flowering stage (12.4%), flowering stage (16.6%) and full fruiting stage (23.6%). This component was missing in the oils of plants in the fruiting stage, which contained a high concentration of cis-sabinene hydrate. In the oil obtained from plants in other stages, cis-sabinene hydrate varies between 0.7% and 1.2%. Oils of plants from the natural populations were rich in thymol (37.6%), carvacrol (13.2%) and p-cymene (11.1%) in the pre-flowering stage. The amount of p-cymene rises sharply in the oil of plant in post fruiting stage (57.14%), while the amount of thymol and carvacrol drops significantly (1.3%; 0.4%).

S. montana subsp. *pisidica* contained much more essential oil in the pre-flowering stage (0.8%) compared to the post-flowering stage (0.3%). The plants from the natural population were very rich in oil (1.2%). In the pre-flowering stage the oil obtained from cultivated plants contained mostly carvacrol (43.5%), α -terpinene (17.5%) and thymol (11.1%). In the post-flowering stage the concentration of these components decreases (19.3%; 5.6%; 5.2%), while p-cymene (30%) and linalool (13.7%) emerge as dominant. In the oil of plants in the pre-flowering stage the p-cymene content amounted to 5.3%, while the concentration of linalool was very low, 0.85%. Plants collected from natural habitat exhibited a domination of p-cymene (24.9%), cis-sabinene hydrate (15.4%) and thymol (11.1%). Cis-sabinene hydrate in oil of cultivated plants appeared in a 1% concentration in pre-flower-

ing plants and 1.4% in plants in the post-flowering stage.

The high degree of variation in the oil content, as well as qualitative and quantitative composition of the volatile constituents, revealed a strong influence of environmental conditions and phenological stages on the nature of plant chemical composition that has an important role in plant adaptation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is supported by the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia, through grant No. 173021 and 173030.

REFERENCES

1. Šilić, Č. (1979): Monografija rodova Satureja L., Calamintha Miller, Micromeria Bentham, Acinos Miller i Clinopodium L. u flori Jugoslavije, 172-262. Zemaljski muzej BiH, Sarajevo.
2. Skočibušić, M., Bezić, N. (2003): Chemical Composition and Antidiarrhoeal Activities of Winter Savory (*Satureja montana* L.) Essential Oil. *Pharmaceutical Biology*, 41, 8, 622-626.
3. Bezić, N., Skočibušić, M., Dunkić, V. (2005): Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils. *Acta Botanica croatica*, 64, 2, 313-322.
4. Fraternali, D., Giamperi, L., Bucchini, A., Ricci, D., Epifano, F., Genovese, S., Curini, M. (2007): Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Satureja montana* from central Italy. *Chemistry of Natural Compounds*, 43, 5, 622-624.
5. Čavar, S., Maksimović, M., Šolić, E.M., Jerković-Mujkić, A., Bešta, R. (2008): Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chemistry*, 111, 648-653.

ESSENTIAL OILS COMPOSITION VARIABILITY IN *SALVIA OFFICINALIS* L. FROM ALBANIA AND KOSOVA

V. Papajani-Toska¹, M. Hatibi², B. Basha¹, U. Asllani³

¹Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Tirana, Albania.

²Kosova Medicines Agency, Prishtina, Kosova.

³R&D Department, Alb-Ducros, Albania

INTRODUCTION

Salvia officinalis L. (Sage) is distributed all over Albania from 50-1200 m, especially in calcareous formation. The extracts and essential oils of sage are used as spice and for healing of different diseases. Its essential oils of various chemotypes (cis-thujone, 1,8-cineole, camphor etc.) exhibit antioxidant, anti-inflammatory, antispasmodic, antimicrobial and stimulant properties.

Albania exports 1500-1700 tons of sage leaves annually, while the other 1500 tons of leaves are used for the production of the oil. About 60% is exported to the USA.

Sage is cultivated in few regions of Kosova, especially the last years. The variability of the composition of *Salvia officinalis* L. essential oils from different regions of Albania and Kosova was determined in this study.

MATERIALS AND METHODS

The plant materials for distillation were collected from wild growing populations of sage in different parts of Albania (Kukes, Dajti, Elbasan, Berat, Tepelena, Llogara) and from cultivated population of sage in the region of Istog (Kosova), during the flowering period. The air-dried

plant materials, were subjected to hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus according to standard procedures.

The essential oils were analyzed using a Shimadzu GC-14B (FID detector) fitted with a fused silica column HP-5MS (60m x 0.25mm, film thickness 0.25mm), split 1: 60, temperature programmed from 60°-240°C at 2°C/min with helium as the carrier gas at the flow rate of 1.0 ml/min, sample injection 2 ml. The injector and detector temperatures were kept at 250°C and 270°C respectively. GC/MS analyses of the oils were run on a Hewlett-Packard mass spectrometer HP 5970 B, ion source 70 eV, coupled with a gas chromatograph HP 5890A with fused silica capillary column 50m x 0.21mm, film thickness 0.30mm, coated with SE-54 temperature programmed from 50°-260°C at 2°C/min using Helium as the carrier gas with a flow rate of 0.4 ml/min. The essential oil of sample from Kosova was analyzed using a GC/MS Agilent 7890A, temperature programmed from 60°-260°C at 5°C/min using Helium as the carrier gas with a flow rate of 0.4 ml/min. Identification of individual components was made by comparison of their retention times with those of analytical standards and by computer searching, matching mass spectral data with those held in Wiley / NBS library of Mass spectra. For quantification purposes were used area percent reports, obtained by GC (FID).

RESULTS AND DISCUSSION

The essential oils yield of Albanian sage samples ranged from 1.8% - 2.5% and 1.57% from Kosova sample. The GC and GC/MS results reported that the quantitative of major compounds in the essential oils of Albanian sage samples ranged as follows: 1,8 cineole from 12.64% (Tepelena) to 23.38% (Berat); α -thujone from 13.12% (Berat) to 25.41% (Kukes); β -thujone from 2.10% (Llogara) to 6.67% (Kukes); camphor from 20.63% (Kukes) to 36.5% (Tepelena); borneol from 3.12% to 8.28% (Llogara); β -caryophyllene from 4.26% (Kukes) to 7.20% (Tepelena). The major compounds in the sage essential oil from Kosova sample were: 1,8 cineole 12.68%; α -thujone 22.01%; β -thujone 3.03%; camphor 10.75%; d-ledol 8.63%; β -caryophyllene 6.28%; β -humulene 5.68%.

CONCLUSION

The essential oils of the investigated Albania sage reveal a large variability, containing different percentages of common compounds. We concluded that Albanian sage species could be grouped into chemotypes with 1,8 cineol and borneol; α -thujone and β -thujone chemotype; camphor and sesquiterpene chemotypes. Close examination of the GC and GC/MS data reveals that sage oil from region of Kosova possessed higher quantity of sesquiterpene and lower quantity of camphor in contrast with the oils from Albanian regions. Meanwhile, similar quantity of 1,8 cineole and β -thujone in essential oils from Kosova and north/south regions of Albania are detected.

REFERENCE

1. Trease and Evans, Pharmacognosy, 15th edition, London, 2002; 255-256, 259.
2. Paparisto K., Demiri M., Mitrushli I., Qosja X., Flora of Albania, Tirana, 1996.
3. Pharmacopoea of Italian Republic, X, suppl. 1988, 1991.
4. Asllani U., The essential oils of Albanian Aromatic Plants, Tirana, Albania, 2002; 230-234.
5. Karousou R., Hanlidou E., kokkini St., The sage plants in Greece; Distribution and infraspecific variation. In: Kintzios, Sp. E. ed. Sage, The genus *Salvia*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 2000; 27-46.
6. Kongjika E., Babani F., Mullaj A., Bacu A., Dingul L., Toska-Papajani V., Scientific evaluation of aromatic-medicinal species. Perspectives of cultivation, Monography, Tirana, Albania, 2005.
7. Massada Y., Analysis of Essential oils by Gas Chromatography and Spectrometry, Wiley, New York, 1976.
8. Adam R., Identification of Essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, Allured, Carol Stream, IL, 1995.

CHEMICAL COMPOSITION OF ROSEMARY OILS FROM ALBANIA

Vilma Papajani¹, Klodiola Dylgjeri², Erjon Troja¹, Entela Haloçi¹.

¹Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Tirana, Albania.

²Pharmaceutical private sector, Tirana, Albania.

INTRODUCTION

Rosmarinus officinalis L. (Lamiaceae) is a small evergreen which grows wild in most Mediterranean countries. It is cultivated in Albania and is widespread in southern and central regions. *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary) is one of the most important aromatic plant exported from Albania. The therapeutic properties of rosemary oil are analgesic, carminative, cholagogue, digestive, diuretic, emmenagogue, nervine, rubefacient, stimulant, improving memory etc. The oil finds its main use in the perfumery industry and is frequently used in aromatherapy. The aim of the study is the determination of chemical composition of essential oils from Albanian rosemary species, as a contribution to the characterization of their geographical and biochemical variability.

MATERIALS AND METHODS

Aerial parts of rosemary plants were collected, at full flowering, in different parts of south (Fier, Vlora, Berat) and central Albania (Tirana, Durres) during years 2007-2009. Voucher specimens of population are deposited at the Herbarium of Faculty of Science, University of Tirana. The air-dried plant materials, were subjected to hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus according to standard procedures.

The essential oils were analyzed using a Shimadzu GC-14B (FID detector) fitted with a fused silica column HP-5MS (60m x 0.25mm, film thickness 0.25mm), split 1: 60, temperature programmed from 60°-240°C at 2°C/min with helium as the carrier gas at the flow rate of 1.0 mL/min, sample injection 2 mL. GC/MS analyses of the oils were run on a Hewlett-Packard mass spectrometer HP 5970 B, ion source 70 eV, coupled with a gas chromatograph HP 5890A with fused silica capillary column 50m x 0.21mm, film thickness 0.30mm, coated with SE-54 temperature programmed from 50°-260°C at 2°C/min using Helium as the carrier gas with a flow rate of 0.4 mL/min.

Identification of individual components was made by comparison of their retention times with those of analytical standards and by computer searching, matching mass spectral data with those held in Wiley / NBS library of Mass spectra. For quantification purposes were used area percent reports, obtained by FID.

RESULTS AND DISCUSSION

The results reported that the quantitative yield of rosemary essential oils, expressed in terms of percentage of dry matter, ranged from 1.2% (samples from Vlora) to 2% (samples from Durres).

Over 25 compounds were detected in the oils, from which 20 could be identified. The principal constituents identified were 1,8 cineole, camphor, verbenone, borneol, α -terpineol, linalool, terpinolene, limonene, β -pinene, β -caryophyllene, α -humulene etc. Examined of the quantitative data reveals that the major components vary depending upon the region. The ranges found for the main constituents were as follows: 1,8 cineole from 12.04% (Vlora) to 16.67% (Tirana); camphor from 9.91% (Vlora) to 16% (Fier); verbenone from 6.8% (Durres) to 12.59% (Fier); α -terpineol from 12.12% (Durres) to 20.88% (Fier); β -pinene 9.55%

(Vlora) - 17.65% (Durres); borneol from 5.21% (Durres) to 9.8% (Fier) etc. The total of oxygenated constituents range from 44.13% (Durres) to 66.07% (Fier) and the hydrocarbons compounds range from 13.34% (Vlora) to 27.22% (Tirana).

CONCLUSION

Rosemary plants cultivated in Albania have a high content of essential oil.

Compared with other rosemary oils, Albanian oils were more similar to those of Italian origin due to their 1.8 cineole, camphor, β -pinene contents. Close examination of the GC and GC/MS data reveals that rosemary oils from center regions of Albania possessed higher quantity of hydrocarbons, especially monoterpene hydrocarbons and lower quantity of oxygenated constituents in contrast with the oils from southern regions that possessed higher quantity of oxygenated components.

REFERENCES

1. Trease and Evans, Pharmacognosy, 15th edition, London, 2002; 255-256, 260.
2. Paparisto K., Demiri M., Mitrushi I., Qosja X., Flora of Albania, Tirana, 1996.
3. Pharmacopoea of Italian Republic, X, suppl. 1988, 1991.
4. Pintore G., Usai M., Batto G., Tomi F., Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia, Flavor Frag. J., 17; 15, 2002.
4. Lawrence B., Progress in essential oils, Perfumer and Flavorist, 20; 47-54, 1995.
5. Massada Y., Analysis of Essential oils by Gas Chromatography and Spectrometry, Wiley, New York, 1976.
6. Adam R., Identification of Essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, Allured, Carol Stream, IL, 1995.

ETHNOBOTANICAL AND ETHNOMEDICINAL USES OF PLANTS IN TWO REGIONS OF ALBANIA

Vilma Papajani¹, Dorina Shengjergji², Mirela Miraçi¹, Suela Kelliçi¹, Erina Hilaj³

¹Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Tirana, Albania.

²Department of Pharmacy, UFO University, Tirana, Albania.

³Pharmaceutical private sector, Albania.

INTRODUCTION

According to World Health Organization 80% of the world's population relies on traditional medicines for their primary health care needs. Medicinal plants of the endemic flora are traditionally used in Albania as therapeutic means, especially in rural areas.

This study aims to identify and to determinate the medicinal plants in two Albanian regions and their traditional therapeutically uses, in order to contribute into the preservation and enrichment of ethnobotanical knowledge.

MATERIALS AND METHODS

Research was carried out in two regions of central Albania during the year 2010, in the rural areas of Durresi and Elbasan. The information on medicinal uses of the endemic plants was collected by interviewing native people, mainly farmers, elderly people, local herbal drugs sellers, traditional herbal medicine practitioners, housewives. A total of 160 inhabitants (average 65 years old) were interviewed. The plants collected, indicated by the locals, have been identified according to "Flora of Albania". Voucher specimens of the collected plants are

preserved in the herbarium of Department of Pharmacy. The plants are arranged in alphabetical order of their botanical names followed by the family, vernacular name, plant parts used and a brief note on its ethno medicinal use, methods of preparation and application. The ethnobotanical information collected was analyzed to obtain the following data: number of useful plants mentioned, number of botanical families and the most common plants, plants to which most uses were attributed, parts of plants most frequently mentioned etc. The frequency of citations for each of the reported plants, was used as a basis to identify and to calculate the most frequently medicinal plants occurring in the study area. A comparative analysis with specific ethnobotanical literature was carried out in order to highlight particularly interesting aspects or uses not previously described in the specific ethnobotanical and ethnomedicinal literature.

RESULTS AND DISCUSSION

Ninety-six medicinal species belonged to 43 families are listed in this study. The families most frequently present are Liliaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Solanaceae and Rosaceae. The uses of the recorded species relate to mild ailments, mainly those of skin, gastrointestinal disorders, urinary apparatus diseases etc. The medicinal plant preparations were applied through different routes of administration like oral, topical or dermal, and nasal routes. However, oral application (over 70%) was the highest and most commonly used route of application followed by topical or dermal application. The main vegetal part used in the preparation of the remedies was the leaf and the infusion was the main mode of preparation. Fourty plants as *Hypericum perforatum* L., *Salvia officinalis* L., *Cichorium intybus* L., *Allium sativum* L., *Origanum vulgare* L., *Crataegus* spp., *Juniperus communis* L., *Teucrium polium* L., *Laurus nobilis* L., *Ulmus campestris* L., *Trifolium pratense* L. etc., were the most frequently ones in the study area.

CONCLUSION

Phytotherapy in central Albania is nowadays practiced by some elderly people who resort to medicinal plants only for mild complaints. The study also highlights the uses of some plants, not previously described in the specific ethnobotanical and ethnomedicinal literature as example: *Paliurus aculeatus* L. as antidiarrheal; *Cercis siliquastrum* L. in respiratory system disorders; *Ecballium elaterium* Rich. in liver diseases and jaundice; *Alopecurus myosuroides* Huds., *Juncus acutus* L. in urinary apparatus diseases; *Physalis alkekengi* L., *Solanum nigrum* L., *Trigonella corniculata* L. in skin diseases, etc. These plants deserve to be taken into consideration for further phytochemical investigation.

REFERENCES

1. Papparisto K., Demiri M., Mitrushi I., Qosja X., Flora of Albania, Tirana, 1996.
2. Vangjeli J., Ruci B., Mullaj A., Papparisto K., Flora of Albania, Tirana, 2000.
3. Kokalari P., Sima Z., Xinxo P., The use of medicinal plants in family, Tirana, 1980.
4. Heinrich M., Barnes J., Gibbons S., Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy, London, 2004.
5. Sima Z., Papajani V., Pharmacognosy, Tirana, 2008.
6. Imeri A., Mullaj A., Dodona E., Coastal vegetation of the Lalzi bay, Botanica Serbica, 34 (2); 99-105, 2010.

EVALUATION OF SEVERAL METHODS FOR THE EXTRACTION OF SAPONINS FROM HEDERA HELIX LEAF COLLECTED IN ALBANIA

Rezarta Shkreli, Enkelejda Goci

Kristal University, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, Tirana, Albania

INTRODUCTION

Hedera Helix is a climber evergreen plant from 3 to 50 meters high which grows in Western Europe and Asia and in USA. It is widespread in Albania, found in rocks, on the walls and on the wood. It consists of triterpenic saponins: Hederacoside B and C (3-5%), β and α hederin, oleanolic acid, flavonoids, phenolic acids. *Hedera* saponins are expectorant compounds helping the liquefaction of bronchial secretions. Parts of saponins exceed bronchial cell wall reaching the fluid of bronchial secretions. These compounds are bitter and irritating in the mouth causing a cough that helps removal of mucus from the lungs. According to the literature saponins can be extracted with water, diluted alcohol from plant material. Less polar solvent such as: ether, chloroform cause precipitation of the saponins from their concentrate extract. There are no results about saponins extraction methods from *Hedera Helix* grown in Albania so it would be so interesting to select several extraction methods and to evaluate their concentration in hederasaponins.

OBJECTIVES

The aim of this study is to determine and to compare some methods for saponins extraction from *Hedera Helix* leaves collected in Albania

METHODS

Hedera leaves were collected in 2010 by "Filipi.Co" in the industrial area of Kurbin, Albania specialized in collecting and preparing medicinal aromatic plants. Five different methods were performed for alcoholic hederasaponins extraction:

- » Maceration with diluted ethylic alcohol for 3 days in room temperature.
- » Multiple Maceration with diluted ethylic alcohol: first and second maceration for 3 days with half quantity of solvent.
- » Percolation method: first maceration with small quantity of solvent and second maceration in percolator for 24 hours.
- » Ultrasound method with solvent for 2 hours, and:
- » Soxhlet extraction with diluted alcohol in soxhlet apparatus.

All five extract were filtered and evaporated until the same concentration. TLC method was used for their evaluation. Solvent system was: chloroform: glacial acetic acid: methanol: water 60:32:12:8. Detection solvent; vanillin; phosphoric acid reagent. (VIS)

RESULTS

The five methods were efficient in extraction of saponins from *Hedera Helix* collected in Albania. Mixture of 2 ml extract with 2 ml water and foam formation presented saponins. TLC method showed the bisdesmosidic triterpene glycoside, Hederacoside C as a dark grey-blue zone in the lower Rf range 0,15 - 0.2 for all five extracts. The zone was different and represent more or less concentrations. Whereas the monodesmosides β and α hederin migrate up to Rf 0.7-0.8 only for percolator and soxhlet extracts.

CONCLUSIONS

Percolator method represented good-result in saponins extraction, then was Soxhlet, double-maceration, maceration and finally ultrasound method.

REFERENCES

- 1- Cioaca C and al. The saponins of *Hedera Helix* with Antibacterial Activity. *Pharmazie*, Sept 1978; 33 (9): 609-10.
- 2- Blumenthal M, ed *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs* Newton, MA Integrative Medical Communications: 2000.
- 3- PDR for Herbal Medicine, 2nd edition Montvale, NJ: Medical Economics Company: 2000:276.
- 4- British Pharmacopoeia 2007, 5th edition.
- 5- World Health Organisation, Quality control methods for medicinal plant materials, Switzerland, 53.
- 6- Wagner, H and Bladt, S: *Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas*, second edition, 320-322.

PRELIMINARY DATA ON ANALYSIS OF METHANOL EXTRACTION OF TUBERS OF *GYMNOSPERMIUM ALTAICUM* SUBSP. *SCIPETARUM*

Sokol Abazi¹, Elmira Mehmeti², Jonida Salihila¹

¹Faculty of Sciences, Tirana University Albania

²Food Safety and Veterinary Institute, Albania

INTRODUCTION

Albania is very rich in medicinal and aromatic plants, only a limited number of them is studied, mainly for their essential oil composition. Recently Albanian biologist discovered a new plant unknown before in Albania. The DNA analysis showed that this is a sub species of *Gymnospermium altaicum*. The name *Scipetarum* was proposed by Albanian biologists but is not registered yet. *Gymnospermium altaicum* subsp. *scipetarum* has been found recently in Albania in the regions of Elbasani and Gjirokastra.

This plant was first described in Albania from Papanisto & Qosja¹ in 1976. The name *scipetarum* was given by Mayer & Pulevi², with the spelling *G. scipetarum*. There are reports that the same plant has been found in Montenegro, too³. The *Gymnospermium* plants of the western Balkan Peninsula are best treated as a subspecies of the wide-ranging *Gymnospermium altaicum*, which is from the Altai Mountains. In our laboratory we were interested in screening the chemical composition of tubers of this plant. In this paper we will present the preliminary results on the analysis of the tubers of this plant extracted with methanol. The analysis and identification was made with GC-MS.

MATERIALS AND METHODS

This is a perennial plant with tubers between 8-12cm. Stem is thin and tall up to 20 cm and has yellow flowers. The tubers of the plant were collected during the month of November. Their diameter goes from 2cm up to 8 cm depending on the age of the plant. They were cleaned, chopped in small pieces, dried till constant weight at RT, grinded and then extracted with methanol. Methanol extraction was performed under reflux for 3 hours by adding 1% tartaric acid in order to get also some nitrogen containing components. After evaporation of solvent water was added and several extractions with chloroform of acidic and basic water phases were performed, the collected fractions

were analyzed with TLC, GC-MC, HPLC. GC's were done in a Varian instrument equipped with a ZB-5 column, 30m long. The oven conditions were: the temperature was kept at 80°C for 1 min, then a gradient of 5°C/min up to 280°C.

RESULTS AND DISCUSSIONS

For the methanol extraction were taken 30.17gr of grinded plant which were dissolved in 300ml of ethanol. 3gr of tartaric acid was added and the mixture was refluxed for 3 hours. After evaporation of solvent we got 10.35gr of crude extract. This crude extract was then dissolved in 200 ml of 1% HCl and extracted three times with 50ml of chloroform. After evaporation of chloroform we got 0.35gr of organics which correspond to a yield of 1.31% of the dried plant. Then the aqueous phase was basified with ammonia to Ph=9 and extracted three times with 50ml of chloroform to give 0.09gr of organics which corresponds to a yield of 0.29%. These two fractions were analyzed with TLC which showed that both fractions contain products of a very different polarity. There are more non-polar compounds in the crude taken from the acid phase than in the basic one.

In order to better analyze and identify the volatile compounds we performed a GC of those two fractions. The chromatograms were very charged with peaks and the separation was not so easy. With the help of MS detector we were able to identify more than 50 compounds on these fractions. But in order to facilitate that separation of fractions by flash chromatography is a must. At the time being we are working on that. In order to identify some heavier components we are now performing analysis of these fractions on HPLC using a Shimadzu instrument equipped with DAD detector. These data are not available yet and they will be subject of another paper soon.

As a conclusion we might say that extraction of tubers with methanol allows extraction of a large number of organic compounds with wide range of polarity. More than 50 volatile components are identified by GC-MS. In order to better identify the substances separation by column chromatography is necessary.

REFERENCES

- 1.Papanisto, K. Qosja, Xh. 1976. *Bul. Shkencave të Natyrës, Universiteti i Tiranës*, 30(5,2): 95.
- 2.http://arctos.database.museum/TaxonomyResults.cfm?full_taxon_name=Gymnospermium+altaicum
- 3.Petrović, D. Stešević, D. Vuksanović, S. 2008. Materials for the red book of Montenegro. *Natura Montenegrina*, 7(2) 2008, 605-631

CHEMICAL PROFILE OF OLIVE OIL WITH *HYPERICUM PERFORATUM* EXTRACTS

Sokol Abazi, Jonida Salihila

Faculty of Sciences, Tirana University Albania

INTRODUCTION

Olive oil is very well known for its beneficial properties for human health. Olive and olive oil have an important nutritive and economic significance for Albania. Numerous studies have been conducted on olives and olive oil which testify the great nutritive benefits that olive oil has. One of the most important efforts in improving its nutritive value is the addition of other substances coming from the extraction of medicinal plants. In order to better improve its food qualities we were interested in studying its chemical composition after having extracted some chemical components from *Hypericum perforatum*. The so called Oleum Hyperici is well known and has been used mainly for skin treatment, but there are some examples of use in treatment of ulcers and other stomach diseases¹. This oil has been prepared using fresh plant and extracting it for 40 days in the sunlight². Analysis from Oleum Hypericy bought from the market showed that its physical and nutritive parameters were deteriorated. Acidity was very high and so was the peroxide number. Our goal was to find extraction condition in which the active components of *Hypericum perforatum* could pass in to the oil, but not changing its nutritive qualities.

MATERIALS AND METHODS

The olive oil was chosen from the olives collected from the region of Tirana. This is oil with parameters of *extra virgin* olive oil in accordance with EU regulation³. The plant was taken from plant collectors and its exact origin is not well known. Different extraction conditions were chosen for that purpose. All extractions were performed at low temperature, not higher than 40°C, in order not to deteriorate olive oil qualities. Different amount of plant, 1%, 3% and 5%, was used and different extraction times, 1 week, 2 weeks and 1 month, were studied. Also the effect of the light in this process was studied. In order to better identify the components of the plant in the olive oil, the plant was extracted separately with hexane in Soxhlet apparatus. This extract was then analyzed with GC-MS. GC's were done in a Varian instrument equipped with a ZB-5 column, 30m long. The oven conditions were: the temperature was kept at 80°C for 1 min, then a gradient of 5°C/min up to 280°C. All different extracts taken from different conditions were analyzed for their physical properties like: acidity and peroxide number. These experiments were done in order to see if there were any changes in the olive oil because of the components of *Hypericum perforatum*. At the same time each experiment was analyzed with GC-MS in order to see its chemical profile of fatty acids and the components of *Hypericum perforatum* extracted from the oil.

RESULTS AND DISCUSSIONS

From the analysis of physical parameters was concluded that the best conditions were those which used 1% of plant extracted for 1 month in darkness. In such conditions acidity and peroxide number remained unchanged. The experiments carried out under the sunlight showed an increase in the peroxide number. This might be explained of all the photosensitive radical reactions that the sun light induces. For each experiment we did analyze the chemical profile of fatty acids and compared it with the original olive oil prior to extraction. In all cases we did

not see any changes on the chemical profile. Also we analyzed the chemical composition of the extraction of *Hypericum perforatum* with hexane under Soxhlet condition in order to better identify the peaks coming from the plant. From the taken chromatograms we were able to see that in all experiments we do have components coming from the plant. Samples with a longer time of extraction showed a higher percentage of plant components. Even after one week we could see that there are some small peaks coming from the plant. After one month of extraction there was not any significant increase of plant components in oil.

As a conclusion we could say that extraction of 1% plant in olive oil under darkness condition give a good yield of extraction of plant material in oil and do not deteriorate the physical parameters of olive oil. Continuing extraction for more than one month does not give any increase in the yield of extraction. Further experiments with longer extraction time are undergoing in our laboratory.

REFERENCES

1. Zdunić G, Godevac D, Milenković M, Vucićević D, Savikin K, Menković N, Petrović S. Evaluation of *Hypericum perforatum* oil extracts for an antiinflammatory and gastroprotective activity in rats. *Phytother Res.* 2009, 1559-64.
2. Maisenbacher P, Kovar KA. Analysis and stability of *Hyperici oleum*. *Planta Med.* 1992, 351-4.
3. Commission Regulation (EC) No 1176/2003 and Commission Regulation (EC) No 1044/2006 on marketing standards for olive oil

ORGANIC COMPOUNDS IN TOBACCO (*NICOTIANA TABACUM* L.) FROM ORIENTAL VARIETIES

Klincarska-Jovanovska I¹, Cvetanovska L¹, Cvetanovska A¹, Srbinska M², Bauer-Petrovska B³

¹Institute of Biology, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Skopje, R. Macedonia

²Tobacco Institute, Prilep, R. Macedonia

³Pharmaceutical Faculty, Skopje, R. Macedonia

We have examined total concentration of organic molecules in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.) from the crop 2007, cultivated in field conditions. The analyses were made on different oriental types: PRILEP (P-23) and JAKA (Jv-125/3) obtained from Tobacco Institute, Prilep, R. Macedonia.

Analysis material from leaves was collected from three insertions (lower, middle and upper leaves). Material has been dried on 50°C temperature as ideal conditions for its fermentation.

The concentration of total and soluble sugars was quantified by using the method of Dubois et al. (1962), spectrophotometrically measurements for nicotine concentration (236, 260, 282nm) and quantitative analysis on the content of total nitrogen as well as proteins (Kjeldahl, 1883). By drying the material on 105°C or 9000°C we have calculated the humidity and ashes of the material, especially for their direct proportion to the concentration of nicotine and proteins. Polyphenols were quantified mathematically.

The results from our experiment gave a preview of the organic production in tobacco plants and they refer to the total concentration of particular significant secondary biomolecules and alkaloid derivatives. The measured parameters have direct influence on the quality vein of fermented tobacco and have the possibility to change

physical and taste characteristics in tobacco products.

Plant organs that have greatest vitality in general have highest concentration of nicotine, as acetic or malic acid. Nicotine synthesis takes part right after the first cotyledon is formed. Tobacco maturation correlates with increasing the concentration of nicotinic nitrogen. According to the concentration of nicotine, tobacco varieties can be divided into three groups: high nicotinic (more than 3% nicotine), middle nicotinic (1-3% nicotine) and low nicotinic (less than 1% nicotine). Concentration of nicotine is not consistent: it depends on the ecological conditions as well as the vegetative period of the plant (Wang et al., 2009; Cai et al., 2009). Despite nicotine, nornicotine, anabasine, myosmine, nicotrine, anatabine and 2,3-dipyridil are main alkaloids in tobacco plants.

Variety of PRILEP (P-23) has significant higher concentration than variety of JAKA (Jv-125/3), which has influenced the high quality ranging of this tobacco raw. Our results indicated great amount of total sugars in both varieties (more than 50% of total organic matter). Speaking of oriental tobacco (PRILEP and JAKA) confirmation of the connection between concentration of carbohydrates and quality of tobacco raw could be established (Vittin, 1918 has reported this assumption as a result of his researches). According to the tobacco quality estimated by the content of soluble sugars, tobacco with concentration of 14-18% has been classified as raw with high quality. Variety PRILEP has average concentration of 30% soluble sugars, which has contributed to the great quality of this tobacco material. We have made similar conclusions for the variety of JAKA as well (27-34% soluble sugars), so that the raw is suitable for producing one of the worlds best tobacco products.

Carbohydrates have important role in plant metabolism, not only because of the photosynthetic activity, but also for the aromatic and tasteable performances of tobacco. Precise determination of sugars is one of the essential parameters for proper classification of the raw by its quality (Troje et al., 1997). This significance has been particular pointed by the analysis of proteins in material. These primary biomolecules are essential matters for maintenance of cell structure and have important role in physical characteristics of oriental tobacco. In distinction of sugars, proteins have meaningful function in decreasing positive aromatic texture of tobacco. The importance of the sugar component in tobacco products has been defined by the Schmuck value, which has been considered as proportion of soluble sugars and proteins. Percentages of proteins decrease proportionally to the plant maturation processes. Variety of PRILEP (P-23) has lower amount of proteins than the variety of JAKA (Jv-125/3). It has been considered that nitrogen incorporation in plants has been intensified during intensive plant growth (Wang et al., 2008). This consideration has brought the explanation for the high concentration of nitrogen in lower insertions in both examined varieties.

The material we have used for experimenting has shown 3.9-8.2% of polyphenols. These secondary biomolecules gave the raw specific aroma, which relies on the fact that the experimented species (P-23 and Jv-125/3) are also names as aromatic oriental varieties of tobacco.

REFERENCES

- Cai, L., Yang, J., Yin, Q., Li, Y. 2009. Effects of drought stress on nicotine conversion in burley tobacco plants at rapidly growing stage. *Acta Tabacaria Sinica* 15(3):63-66
- Troje, Z.S., Frobe, Z. & Perovic, Dz. 1997. „Analysis of elected alkaloids and sugars in tobacco extract“, *Journal of Chromatography A*. 775:101-107
- Wang, J., Wang, S., Bi, Q., Yu, S., Yang, Y., Sun, F., Wang, A., Yan, Q., Wang, P. (2009). Effects of N,P,K Rates on Yield and Quality of Flue-cured Tobacco Honghuadajinyuan. *Chinese Tobacco Science*
http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-ZGYV200905009.htm

ОРГАНСКА МАТЕРИЈА КАЈ ТУТУНОТ (*NICOTIANA TABACUM* L.) ОД ОРИЕНТАЛСКИ СОРТИ

Клинчарска-Јовановска И¹, Цветановска А¹,
Цветановска Л¹, Србиноска М², Бауер-Петровска
Б³

¹Институт за Биологија, Природно-математички факултет, Скопје, Р. Македонија

²Институт за Тутун, Прилеп, Р. Македонија

³Фармацевтски Факултет, Скопје, Р. Македонија

Испитувана е содржината на органските молекули кај тутунот (*Nicotiana tabacum* L.) од реколтата 2007, култивирани во полски услови. Анализирани се почвени култури од две сорти на тутун (*Nicotiana tabacum* L.): ПРИЛЕП (P-23) и ЈАКА (Jv-125/3), одгледувани во полски услови на територијата на ЈНУ Институт за тутун, Прилеп, Р. Македонија.

Листовите се земени како материјал за анализа, колекциониран по појаси (долна, средна и горна инсерција) и исушен на температура до 500С, со што се овозможени идеални услови за негова ферментација.

Во експериментот направени се следните анализи: квантитативно одредување на содржината на вкупни и растворливи јаглехидрати (Dubois et al., 1962); спектрофотометриско одредување на содржината на никотин на три бранови должини (236, 260 и 282nm) и квантитативна анализа на протеините и вкупниот азот (Kjeldahl, 1883). Беше одредена и содржината на влага и пепел преку согорување на материјалот на 1050С т.е. на 9000С соодветно, заради нивната директна зависност од концентрацијата на никотин и белковински материји во тутунот. Содржината на полифенолите беше одредена преку математичка пресметка, користејќи ги добиените вредности за количината на растворливи шеќери во анализираниот материјал.

Резултатите од истражувањето даваат јасна слика за органската продукција кај тутунот и истите се однесуваат на концентрацијата на поедини најзастапени и најзначајни секундарни биомолекули и алкалоидни деривати. Испитуваните параметри директно влијаат на квалитетните особини на ферментираниот тутун и истите ги променуваат физичките, но и вкусови одлики на тутунските производи.

Најголема содржина на никотин се содржи во органите со најголема виталност (листовите), каде истиот се наоѓа во вид на соли на лимонска или јаболчна киселина. Синтезата на никотин започнува веднаш по појавата на првиот нукулец на семето. Старењето на тутунот корелира и со зголемување на содржината на никотински азот. Тутунските сорти според содржината на никотин може да се поделат во три групи: многу никотинозни (повеќе од 3% никотин), средно никотинозни (1-3% никотин) и слабо никотинозни (помалку од 1% никотин). Неопходно е да се напомене дека концентрацијата на никотин не е појава со константен карактер, бидејќи зависи од еколошките услови на вегетациониот период (Wang et al., 2009; Cai et al., 2009). Освен никотинот, алкалоиди кои се во голема содржина застапени во тутунските екстракти се: норникотин, анабазин, никотрин, миосмин, анатабин и 2,3-дипиридил.

Сортата ПРИЛЕП (P-23) има значително повисока количина на шеќери за разлика од сортата ЈАКА (Jv-125/3), што зборува и за високиот квалитет на овој тип на тутун. Добиените резултати

покажуваат голема содржина на вкупните шеќери - околу 50% и кај двете сорти. Кога станува збор за ориенталните ароматични типови на тутун (ПРИЛЕП и ЈАКА) неоспорно е дека постои зависност помеѓу содржината на шеќери и квалитетот на тутунските суровини (појава која е за прв пат опишана од страна на Vittin, 1918). Според поделбата која го карактеризира квалитетот на тутунот преку содржината на растворливите шеќери, тутунот со 14-18% на истите се смета за суровина со висок квалитет. Сортата ПРИЛЕП има просечна содржина на растворливи шеќери од 30%, со што важи за најквалитетниот тутун од овој тип. Оваа карактеристика ваквите тутун ги прави употребливи за изработка на најлуксузните цигари и пури. Слична констатација може да се даде и за сортата ЈАКА (Jv-125/3), бидејќи содржината на растворливите шеќери е од 27 до 34%.

За важноста на јаглехидратите, како примарен продукт на фотосинтетската активност, за физичкиот и вкусовиот квалитет на тутунот зборува и фактот што истите чинат речиси половина од вкупната содржина на органски материји во ориенталските тутун. Прецизната детерминација на присутните шеќери (вкупни и растворливи) е есенцијален параметар за соодветна класификација на тутунскиот материјал според неговиот квалитет (Troje et al., 1997). За прв пат оваа зависност детално била обработена преку анализите за застапеноста на протеините во материјалот. Истите се сметаат за есенцијални материји за одржувањето на структурата на клетките и имаат важна улога за физичките квалитети на ориенталските типови на тутун. Но за разлика од шеќерите, белковините имаат изразено дејство во намалување на вкусовиот квалитет на тутунот. Потенцирањето на важноста на шеќерната компонента за квалитетните особини на тутунските производи е дефинирана преку т.н. Шмуков број, кој претставува однос помеѓу количеството на растворливите шеќери и протеините.

Процентуалните содржини на протеините се намалуваат пропорционално со стареење на растенијата. Сортата ПРИЛЕП (P-23) има значително помалку вкупен азот и протеински материји за разлика од сортата ЈАКА (Jv-125/3). Се смета дека примањето на азотот од страна на растенијата се интензивира во раните стадиуми на развикот (Wang et al., 2008), оттука и високата концентрација на истиот во долната инсерција на тутунот од двете испитувани сорти. Сортите кои беа предмет на нашиот експеримент содржат од 3,9 до 8,2% на полифеноли. Особена карактеристика на полифенолите е изразената ароматичност што му ја даваат на тутунот, па оттаму и вториот назив за сортите P-23 и Jv-125/3 - високо ароматични ориентални сорти на тутун.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cai, L., Yang, J., Yin, Q., Li, Y. 2009. Effects of drought stress on nicotine conversion in burley tobacco plants at rapidly growing stage. *Acta Tabacarina Sinica* 15(3):63-66
2. Troje, Z.S., Frobe, Z. & Perovic, Dz. 1997. „Analysis of elected alkaloids and sugars in tobacco extract“, *Journal of Chromatography A*. 775:101-107
3. Wang, J., Wang, S., Bi, Q., Yu, S., Yang, Y., Sun, F., Wang, A., Yan, Q., Wang, P. (2009). Effects of N,P,K Rates on Yield and Quality of Flue-cured Tobacco Honghuadajinyuan. *Chinese Tobacco Science* http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-ZGYV200905009.htm

PHYTOCHEMICAL AND BIOLOGICAL STUDIES ON METHANOL ROOT EXTRACT OF BOERHAAVIA DIFFUSA

Milić N.1, Aviello G.2, Čanadanović-Brunet J.2, Mandić A.3, Sakač M.4, Borrelli F.2

¹ Faculty of Medicine, Department of Pharmacy, Novi Sad, Serbia,

² Facoltà di Farmacia, Università degli Napoli, Federico II, Napoli, Italy,

³ Faculty of Technology, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia

⁴ Institute for food technology Novi Sad, Novi Sad, Serbia

The Boerhaavia diffusa, perennial herb, belonging to the family of Nyctaginaceae and native of India and Brazil, is used for centuries in Ayurvedic medicine to treat numerous diseases, including liver disorders (jaundice, hepatitis, etc..) gastro-intestinal (as a laxative), kidney problems (stones, cystitis and nephritis), anemia and menstrual syndrome [1]. The roots of *B. diffusa* contain alkaloids (punarnavine), rotenoids (boeravinones A-F), flavonoids, amino acids, lignans (liriodendrine, siringaresinols and mono-beta-D-glucoside), β -sitosterol, tetracosanoic acid, esacosanoids, stearic and ursolic [2]. Although the *B. diffusa* have been widely attributed to a number of pharmacological activities, currently there are no clear scientific data in the literature that confirm its efficacy. Based on the use of *B. diffusa* for the treatment of gastrointestinal diseases, the aim of our study was to: (i) assess, *in vitro*, the effect of a methanol root extract of *B. diffusa* on the intestinal smooth muscle, and (ii) to study the cytotoxic and antioxidant potential. For studies on intestinal motility were used segments of guinea pig ileum stimulated with exogenous contracturant agents (acetylcholine, histamine and barium chloride) or electric stimulation. The cytotoxicity assays were conducted on a cell line of human colon adenocarcinoma (Caco-2), while the antioxidant activity was evaluated not only on Caco-2 cells, but also using a chemical assay of Electron Spin Resonance (ESR). The methanol root extract of *B. diffusa* (1-1000 μ g/ml) inhibited significantly and in a concentration-dependent manner contractions of intestinal smooth muscle is induced by exogenous agonists (acetylcholine, histamine and barium chloride), and electrical stimulation. The inhibitory effect on contractions induced by acetylcholine was altered in the presence of nifedipine and cyclopiazonic acid, suggesting involvement of calcium channels in the mechanism of action of the methanol root extract of *B. diffusa*. Chemical studies of antioxidant activity showed that the methanol root extract of *B. diffusa* (0.1-5 mg/ml) reduced significantly and in a concentration-dependent manner formation of free radicals, with its IC50 of 0.7 mg/ml. The methanol root extract of *B. diffusa* used at concentrations of 0.01-1 mg/ml, did not induce cytotoxic effects in Caco-2 cells. Furthermore, treatment of Caco-2 cells with methanol root *B. diffusa* (0.03-1 mg/ml) significantly reduced the levels of malondialdehyde induced by Fenton's reagent suggesting a potential antioxidant effect. In conclusion, this study has highlighted the spasmolytic effect of a methanol root extract of *B. diffusa*, which could partly justify the traditional use of this plant in the treatment of gastrointestinal disorders and involve calcium channels. In addition, the methanol root extract of *B. diffusa* has not demonstrated *in vitro* cytotoxic action, but a potent antioxidant activity that could justify its use in gastrointestinal disorders of oxidative etiology.

Acknowledgment: This research was supported by Ministry of Education and Science, Republic of Serbia (TR31029)

REFERENCES

1. Gaitonde, B.B., Kulkarni, H.J., and Nabar, S.D. Diuretic activity of punarnava (*Boerhaavia diffusa*). *Bulletins of the Haffkine Institute (Bombay, India)* 1974; 2:24
2. Chakraborti, K.K. and Handa, S.S. Antihypertensive investigations of *Boerhaavia diffusa* L. *Indian Drugs* 1989;27: 161-166
3. Kadota, S., Lami, N., Tezuka, Y., Kikuchi, T. Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa* L. Examination of sterols and structure of new rotenoids, boeravinones A and B. *Chem Pharm Bull.* 1989;37: 3214-3220
4. Čanadanović-Brunet, JM, Djilas, SM, Četković, GS, Tumbas, VT. Free radical scavenging of wormwood (*Artemisia absinthium* L) extracts. *J. Sci.Food Agric.*; 2005;85: 265-272
5. Bhalla, T.N., Gupta, M.B., Bhargava, K. P. Anti-inflammatory activity of *Boerhaavia diffusa*. *Journal of Research in Indian Medicine* 1971;6: 11-15
6. Borrelli, F., Ascione, V., Capasso, R., Izzo, A. A., Fattorusso, E., Tagliabatella-Scafati, O. Spasmolytic Effects of Nonprenylated Rotenoid Constituents of *Boerhaavia diffusa* Roots. *J. Nat. Prod.* 2006;69: 903-906
7. Milić, B.L.J., Djilas, S.M., Čanadanović-Brunet, J.M., and Milić, N.B. Radicali liberi in biologia, medicina e nutrizione. In F. Capasso, R. De Pasquale, G. Grandolini & N. Mascolo (Eds.), *Farmacognosia* (pp. 449-462). Berlin: Springer, 2000

POISONOUS PLANTS THROUGHOUT HISTORY

Biljana Bauer Petrovska, Zoran Kavrakovski

Faculty of Pharmacy, University of Ss. Cyril and Methodius, Skopje

Poisonous plants were known long ago. People gathered them for medical purposes in certain doses, as hunting poison, as well as insecticides. There are over 700 types of poisonous plants (1,2). History of Pharmacy wrote about many poisonous plants that are now indispensable drugs. Empirical knowledge and experience were transferred to each subsequent generation. The introduction to the development of the ideas associated with poisonous plants, as well as the evolution of knowledge increases the ability of pharmacists, physicians and toxicologists to respond to the challenges that arise with the spread of professional services in facilitating the life of human. The beginning of the use of plants, were probably accidental. Chinese people have first written monuments in the works of Shen Nung, the year 2737-2698. BC, for the use of plants for healing, and from poisonous plants they used ephedra.

Egyptians knew many poisonous plants i.e. henbane, common ivy, castor oil plant. The old desert peoples Phoenicians, Babylonians, Jews and Palestinians used among other poisonous plants even and opium. Illyrians had knowledge of various poisons. The Dardanian tribes used poison conium. In the 5th century BC among the ancient people *Bryonia dioica*, *Solanum dulcamara*, conium, hellebore and castor oil plant were mentioned. Among the ancient Greeks conium was used as a judicial poison. In Hippocrates works (459-370 BC), from poisonous plants opium poppy, henbane, belladonna, mandrake, castor oil plant, hellebore and *Asarum europaeum* were mentioned. Theophrastus (370-286 BC) in his book "De historia plantarum" wrote about the poisonous *Veratrum album*, opium poppy, mandrake, henbane, conium, *Aconitum sp.* While describing poisonous effect of plants Theophrastus emphasis the important feature of human to get accustomed with the gradually increasing doses (3). Nikander (204-135 BC) wrote two poems Theriaca and Alexipharmaca, which is also the earliest work relating to poisons and antidotes. Dioscorides (40-80 AD) in his work "De venenis", wrote about poisons and antidotes with guide for the indications and contraindications. In his study Dioscorides classified toxins according to

their plant, animal and mineral origin (4). In it he mentions toxic *Colchicum autumnale* from surrounding the Black Sea. Dioscorides mentions asarabacca for the treatment of fever, sciatica, as a diuretic, but today because of poisonous caused by azaron the use of asarabacca is abandoned. Against intestinal parasites he used male fern, which is now rejected because of poisonous. Poisonous plants in Rome were forbidden by law. Galen (129-200 AD) prepared "Nut Theriac" for Roman emperors, a remedy against bites, stings and poisons. He also wrote De Antidots I and II.

Famed Arab toxicologist Ibn Wahshiya (9th AD) wrote toxicology treatise "Book on Poisons" combining contemporary science magic and astrology. Ibn Wahshiyah, warned of possible complications resulting from use of hashish (5). Arabs from poisonous plants used belladonna, henbane, *Strychnos nux-vomica*, *Colchicum autumnale*. In 9th century Arabs transferred poppy to Persia, India and China. In the 9th century, there were mass poisoning with flour which had many impurities from *Claviceps purpurea*. The disease was called "ignis sacer" and is manifested by severe muscle cramps, and later with gangrene of the lower extremities. In medieval books were discovered first data on the use of *Claviceps purpurea* deliveries, often accompanied by poisoning (6). Paracelsus (1493-1541 AD) introduced dose response concept to toxicology. He wrote that "All things are poison, and nothing is without poison; only the dose permits something not to be poisonous." In the medieval period, women from higher layers in the eyes applied belladonna as a cosmetics mean, for which the plant carries the name Bella-Donna. In 1763 year physician Störck from Vienna discovered the value of *Colchicum autumnale* as a specific tool against gout (6). Since then in the official European medicine was thrown away and shunned because of the toxicity. In toxicological literature as a classic example of poisoning with belladonna's berries from ignorance, the case of collective intoxication of a group of 160 French soldiers was stated in 1825 year (6). Because of opium two opium wars were fought, 1839-1842 and 1857-1860 between China on one side and England, USA and France on the other side (7). 19th century is the century of alkaloids. First Derosne isolated mixture of narcotine and morphine in 1803. In 1806 Serturmer purified morphine and Robik narcotine. Professors from the high Pharmaceutical school in Paris, Peletier and Kaventu, discovered a number of important alkaloids: in 1817 brucine and strychnine, in 1820 quinine. Peletier and Magendi in 1817 discovered emetine, in the same year Geiger discovered aconitine, Runge caffeine, 1842 year Voskresenski isolated theobromine, 1832 year Peletier reveals narceine. French pharmacist Tanret in 1875 discovered (ergotinine) ergotoxin, and in 1878 peletierine and metilpeletierine. Today, many alkaloids are successfully synthesized. However, still some poisonous plants are a major source and feedstock for the production of alkaloids. With chemical, physiological and clinical trials many forgotten poisonous plants i.e. *Aconitum sp.*, belladonna, *Datura stramonium*, male fern, henbane, *Claviceps purpurea*, *Veratrum album*, poppy, *Colchicum autumnale*, castor oil plant, etc. are returned as a pharmaceuticals. Almost all the pharmacopoeias in the world prescribe their drugs with real healing value. But there are cases where former officinal plants such as *Bryonia dioica*, male fern due to their high toxicity were abandonment of scientific medicine (8). Some of them (*Pulsatilla vulgaris* Mill.), are used in homeopathy.

Many poisonous plants are used at different times throughout history and were indispensable in treating many diseases for which has written data in many nations. Each of them contributed little to expand their knowledge and transfer of data from generation to generation. Despite the toxicity poisonous plants found wide application in medicine in preventing or treating of various diseases.

REFERENCES

1. Danon, J., Blanencic, Z. 1989 Hranljivo, lekovito, otrovno i zacinsko bilje, Naucna knjiga, Beograd
2. Kojic, M., Janjic, V. 1991 Otrrovne biljke, Naucna knjiga, Beograd
3. Nikolovski, B. 1995 Prilozi od istorijata na zdravstvenata kultura na Makedonija, MFD, Skopje
4. Hoffman, R., Nelson, L., Howland, M., Lewin, N., Flomenbaum, N., Goldfank, L. 2007 Goldrank's manual of toxicologic emergencies, Mc Graw-Hill, New York
5. Toplak Galle, K. 2005 Domace ljekovito bilje, Mozaik knjiga, Zagreb
6. Tucakov, J. 1948 Farmakognozija, Naucna knjiga, Beograd
7. Dervendzi, V. 1986 Prirodni lekoviti i aromaticni surovini, Nasa kniga, Skopje
8. Kovacevic, N. 2000 Osnovi farmakognozije, Licno izdanje, Beograd

ОТРОВНИТЕ РАСТЕНИЈА НИЗ ИСТОРИЈАТА

Билјана Бауер Петровска, Зоран Кавраковски

Фармацевтски факултет, Универзитет Св Кирил и Методиј, Скопје

Отровните растенија биле познати уште одамна. Луѓето ги собирале за медицински потреби во одредени дози, за добивање отров за ловење, како и за инсектициди. Познати се над 700 видови отровни растенија (1,2). Историјата на фармација запишала многу отровни растенија кои денес се незаменливи лекови. Емпириските знаења и искуства биле пренесувани на секоја наредна генерација. Запознавањето со развојот на идеите поврзани со отровните растенија, како и еволуцијата на сознанијата, ја зголемува способноста на фармацевтите, лекарите и токсиколозите да одговорат на предизвиците кои се јавуваат со ширење на професионалните услуги во олеснување на животот на човекот. Првите почетоци на употребата на растенијата, најверојатно биле случајни. Кинезите се народи кои имаат први пишани споменици во делата на Шен Нунг, 2737-2698 год. п.н.е., за употреба на растенијата за лечење, а од отровните растенија ја користеле ефедрата.

Египјаните познавале многу отровни растенија и тоа буника, бршлен, рицинус. Старите пустински народи Феникијци, Вавилонци, Евреи и Палестинци употребувале покрај другите отровни растенија уште и опиум. Илирите имале знаење за разни отрови. Во племето Дарданци се употребувал отровот кукута.

Во V век п.н.е. кај античките народи се спомнуваат *Bryonia dioica*, песји трс, кукута, кукурек и рицинус. Кај старите Грци кукута бил отров за осудените. Во Хипократовите дела (459-370 г.) од отровните растенија се спомнуваат опиум, буника, помамница, мандрагора, рицинус, кукурек и копитник. Теофраст (370-286 г.) во своето дело "De historia plantarum" пишувал за отровноста на чемерика, афион, мандрагора, буника, кукута, јадиче. При описот на отровното дејство на растенијата, Теофраст го подвлекувал важното својство, човекот да се привикнува на нив со постепено зголемување на дозите (3). Никандер (204-135 г.) напишал две поеми Theriaca и Alexipharmaca, кои се воедно и најрани дела кои се однесуваат за отровите и противотровите. Диоскорид (40-80 г.) во неговото дело "De venenis", ги изнесува отровите и противотровите со упатство за индикациите и контраиндикациите. Во својата студија Диоскорид ги категоризирал отровите според нивното растително, животинско и минерално потекло (4). Во него го споменува

отровниот мразовец од околината на Црно Море. Диоскорид го споменува копитникот за лечење на грозница, ишијас, како диуретик, но, денес поради отровноста предизвикана од азарон, употребата на копитник е напуштена. Против цревни паразити употребувал и машка папрат, која денес е отфрлена поради отровноста. Отровните растенија во Рим биле со закон забранети. Гален (129-200 г.) приготвувал лек против каснување, убоди и отрови. Го напишал делото De Antidote I и II.

Познатиот арапски токсиколог Ибн Вахсиа во IX век напишал "Книга за отрови" со комбинирање на тогашната современата наука, магија и астрологија. Во неа тој укажал на можни компликации при употребата на хашиш (5). Арапите од отровните растенија употребувале помамница, буника, стрихнос, мразовец. Во IX век Арапите го пренеле афионот во Персија, Индија и Кина. Во IX век забележани се масовни труења со брашно кое имало многу примеси од морово рокче. Болеста била нарекувана "ignis sacer" и се манифестирала со јаки грчеви на мускулатурата, а покасно и со гангрена на долните екстремитети. Во средновековните книги откриени се први податоци за употреба на моровото рокче при породувањата, често пропратени со труења (6). Парацелзиус (1493-1541) го вовел концептот доза одговор во токсикологијата. Тој напишал дека сите нешта се отровни и ништо не е без отровно, само дозата дозволува нештата да не бидат отровни. Во средновековниот период жените од повисоките слоеви во очите накапувале козметичко средство од помамница, заради што и растението носи назив Bella-Donna. Во 1763 година виенскиот лекар Сторк ја открил вредноста на мразовецот како специфично средство против гихт (6). Се дотогаш во службената европска медицина бил отфлен и избегнуван поради големата отровност. Во токсиколошката литература како класичен пример на труење со бобици од помамница од незнаење се наведува случај на колективна интоксикација на една чета од 160 француски војници во 1825 година (6). Поради опиумот се воделе две опиумски војни 1839-1842 и 1857-1860 помеѓу Кина од една страна и Англија, Сад и Франција од друга страна (7). XIX век е век на алкалоиди. Прв пат Деросне изолирал мешавина на наркотин и морфин во 1803 година. Во 1806 година Сертурнер го пречистил морфинот, а Робик наркотинот. Професорите на високата фармацевтска школа во Париз, Пелетиер и Кавенту, откриле голем број на важни алкалоиди: во 1817 година стрихнин и бруцин, во 1820 година хинин. Пелетиер и Магенди во 1817 година го откриваат еметин, во истата година Гајгер аконитин, Рунге кофеин, 1842 година Воскресенски го изолирал теоброминот, 1832 година Пелетиер го открива нарцеинот. Францускиот фармацевт Танрет во 1875 година го открил (ерготинин) ерготоксин, а во 1878 година пелетиерин и метилпелетиерин. Денес, многу алкалоиди успешно се синтетизираат. Сепак, сеуште некои отровни растенија се главен извор и суровина за производство на алкалоиди.

Со хемиски, физиолошки и клинички испитувања вратени се во фармацијата многу заборавени отровни растенија: јадиче, помамница, татула, машка папрат, буника, морово рокче, чемерика, афион, мразовец, рицинус и др. Скоро сите фармакопеи во светот ги пропишуваат нивните дроги со реална лековита вредност. Но, има и случаи кога некогашни официелни растенија како *Bryonia dioica*, машка папрат заради големата отровност се напуштаат од научната медицина (8). Понекои од нив (*Pulsatilla vulgaris* Mill.), наоѓаат примена во хомеопатијата.

Многу отровни растенија се употребувале во различни периоди низ историјата и биле незаменливи во лекување на многу болести кај народите за што има и пишани податоци. Секој од нив по малку

придонесувале за проширување на знаењата и пренесување на податоци од генерација на генерација. И покрај токсичноста наоѓаат широка примена во медицината во спречување или лекување на разни болести.

LITERATURA

1. Danon, J., Blanencic, Z. 1989. Hranljivo, lekovito, otrovno i zacinsko bilje, Naucna knjiga, Beograd
2. Kojic, M., Janjic, V. 1991. Otrovne biljke, Naucna knjiga, Beograd
3. Nikolovski, B. 1995. Prilozi od istorijata na zdravstvenata kultura na Makedonija, MFD, Skopje
3. Hoffman, R., Nelson, L., Howland, M., Lewin, N., Flomenbaum, N., Goldfank, L. 2007. Goldrank's manual of toxicologic emergencies, Mc Graw-Hill, New York
4. Toplak Galle, K. 2005. Domace ljekovito bilje, Mozaik knjiga, Zagreb
5. Tucakov, J. 1948. Farmakognozija, Naucna knjiga, Beograd
6. Dervendzi, V. 1986. Prirodni lekoviti i aromaticni surovini, Nasa kniga, Skopje
7. Kovacevic, N. 2000. Osnovi farmakognozije, Licno izdanje, Beograd

DETERMINATION OF TOTAL POLYPHENOLS IN COFFEE (*COFFEA SP*) AND TEA (*CAMELLIA SINENSIS*) PRODUCTS AND COFFEE AND TEA BEVERAGES

Jelena Slavković¹, Sladjana Šobajić²,
Tatjana Kundaković²

¹Medicine and Medical devices Agency of Serbia

²Faculty of Pharmacy, Belgrade University, Serbia

INTRODUCTION AND AIM

Phenolic and polyphenolic compounds are synthesized in plants, in most cases from shikimic acid in phenylpropanoid biosynthetic pathway. There are different classifications of polyphenols, but the most important is the one that follow biosynthetic pathway and structure complexity: simple phenols, phenolic acids, phenyl-propen acids, lignin and lignoids, antocyanins, coumarins, flavans, tanins and flavonoids. The largest and best studied polyphenols group are the flavonoids (flavonols, flavons, catechins, flavanones and isoflavonoids).

Biological activity, especially antioxidative is very often relate to presence of ortho-phenolic groups. Polyphenols have different biological activities such as spasmolytic function, decrease platelet aggregation, endothelial adhesion, have antioxidative function, suppress cancer cell growth and reduce oxidative stress.

Polyphenols can be found in various foods such as vegetables, fruit, dark chocolate, wine, coffee and tea leaf beverages

Total polyphenolic content and ratio of polyphenolic complex in food are different.

This paper presents authors intent to determine the total polyphenol content in coffee and tea products, and coffee and tea beverages, to evaluate the degree of polyphenols' extraction during usual way of beverages preparation, and to see if they could be good sources of polyphenols in everyday diet.

METHODOLOGY

Total polyphenol content was determined in commercial coffee and tea leaf products and coffee and tea leaf beverages using Folin-Ciocalteu. method. The following samples were used: filter bags of green tea (6 samples), filter bags of black tea (1 sample), black and green tea leaves (7 samples), black milled coffee (3 samples), coffee grain (2 sam-

ples), instant coffee (3 samples), grain espresso coffee (2 samples), raw green coffee (1 sample), dietary supplement with green coffee (1 sample), milled coffee beverage (1 sample), instant coffee beverage (1 sample); coffee for take away (5 samples), green tea leaf beverages (3 samples), black tea leaf beverages (3 sample).

The total polyphenol content was expressed as gallic acid equivalent (GAE) in g/100g or g/100ml

RESULTS AND DISCUSSION

Following results were found for total polyphenol content: coffee commercial products 7.90-18.45 g GAE/100 g; tea commercial products 12.55-33.61 g GAE/100 g; tea beverages 0.04-0.16 g GAE/100 ml; coffee beverages 0.12-0.35g GAE /100 ml.

The results are in compliance with literature data for coffee and tea leaf and coffee and tea leaf beverages .

Results showed that extraction of polyphenols from the coffee and tea material under the conditions of the usual preparation methods, is not quintessential, but is satisfactory.

CONCLUSION

Regular consumption of coffee and tea leaf drinks can significantly increase daily intake of polyphenols.

REFERENCES

1. Ronald L. Prior, Xianli Wu, Karen Schaich. Standardized methods for the determination of Antioxidant capacity and Phenolic in foods and dietary supplements. Journal of Agriculture and Food Chemistry 2005, vol 53 : 4290-4302
2. Aneaini C, Ferraro G.E, Filip R. total polyphenol content and antioxidant capacity of commercial available tea (Camellia sinensis) in Argentina. Journal of Agriculture and Food Chemistry 2008, vol 56 : 9225-9229
3. Sanchez-Gonzales I, Jimenez-Escrig A, Sauro-Calixto F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso, Filter). Food chemistry 2005, vol 90 : 133-139.
4. Fukushima Y, Ohie T, Yonekawa Y, Zonemoto K, Aizawa H, Mori Y, Watanabe M, Takeuchi M, Hasegawa M, Tauguchi C, Kondo K. Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population. Journal of Agriculture and Food Chemistry 2009, vol 57 : 1235-1259.
5. Croizen A, Jaganath I, Clifford M. Dietary phenolics : chemistry, bioavailability and effects on health. NPR. Current developments in natural product. 2009, 26: 965-1096

VOLATILE OIL COMPOSITIONS OF SOME ENDEMIC *HYPERICUM* SPECIES OF TURKEY

Esra Eroğlu Özkan¹, Betül Demirci², Şükran Kültür³, Afife Mat¹, Kemal Hüsnü Can Başer²

¹Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Istanbul University, 34112 Beyazıt, Istanbul, Turkey

²Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, 26470 Eskişehir, Turkey

³Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Istanbul University, 34112 Beyazıt, Istanbul, Turkey

ABSTRACT

The chemical composition of the essential oils obtained from the aerial parts of the *H. uniglandulosum* Hausskn. ex Bornm., *H. scabroides* Robson & Poulter, *H. kotschyianum* Boiss., *H. salsugineum* Robson & Hub.-Mor. and *H. thymopsis* Boiss by using the microdistillation and hydrodistillation methods is identified by GC and GC/MS. Finally the results are compared with each other.

INTRODUCTION

The genus *Hypericum* (Hypericaceae) is represented by nearly 80 species grouped under 20 sections in Turkey. Among them, 36 species are endemic. In the traditional medicine of Turkey, the genus is known as “sarı kantaron, kantaron, binbirdelik otu, mayasıl otu” and most of them, especially *H. perforatum*, have been used for the treatment of burns, wounds, hemorrhoid, diarrhoea and ulcers (1-5).

Moreover, aqueous extracts prepared from the flowering aerial parts of the *Hypericum* species are being used in the treatment of psychological diseases such as neuralgia, anxiety, neurosis and depression (6). The preparative forms of the *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) are sold for the treatment of mild to moderate depression in the USA and Europe.

The chemical composition of the *Hypericum* species is composed of naphthodianthrones (especially hypericin and pseudohypericin), achylphloroglucinol derivatives (especially hyperforin and adhyperforin), flavonoids (especially quercetin, quercitrin, hyperoside and biapigenin), tanens, n-alkanes, xanthenes and volatile oils. (7-9).

The volatile oil compositions of about 50 different *Hypericum* species have been identified yet (10-13).

In this study, the oils of 5 endemic *Hypericum* species were obtained by hydro-distillation and microdistillation methods. Then, the oil compositions of the species were identified by GC and GC/MS.

Except the *H. thymopsis*, the volatile oil of which was obtained by hydrodistillation and the oil composition of which was identified before (10), the species investigated in this study were studied for the first time in the literature.

In this study, a comparison between the microdistillation and the hydrodistillation was performed. Also a comparison between the volatile oil compositions of *H. thymopsis* species obtained with different locations was performed.

RESULTS AND DISCUSSION

By hydrodistillation, volatile oils were obtained from the aerial parts of the *H. uniglandulosum*, *H. scabroides*, *H. kotschyianum*, *H. salsugineum* and *H. thymopsis* with yields of 0.67% (v/w), trace (in hexane), 0.67% (v/w), trace (in hexane), 0.67% (v/w), respectively. The analyses were performed by using GC and GC/MS.

%72.7- %99.9 of the oil obtained by hydrodistillation from these spe-

cies were identified. % 93.7 - % 98 of the oil obtained by microdistillation from these species were identified.

2,6 dimethyl-3,5 heptadien-2-one, hexadecanoic acid, α -pinene, nonacosane, spathulenol, β -pinene and baeckeol were characterized as the main components of the oils obtained by hydrodistillation. 2,6 dimethyl-3,5 heptadien-2-one, trans-linalool oxide (furanoid), α -pinene, β -pinene, limonene, dodecanoic acid and baeckeol were characterized as the main components of the oils obtained by microdistillation.

In this study, volatile oil components obtained from 5 endemic species of Turkey by two different methods were identified and compared. The results obtained by hydrodistillation and microdistillation were differs from each other.

As a conclusion, the *Hypericum* species identified in this study have a different profile of the chemical constituents of their volatile oils.

REFERENCES

- E. Tuzlaci, et al, Turkish folk medicinal plants, Part IV: Gönen (Balıkesir). *Fitoterapia*, 72, 323-343 (2001).
- E. Sezik, et al, Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. *J Ethnopharmacol.*, 75, 95-115 (2001).
- E. Yesilada, et al, Traditional medicine in Turkey VI. Folk medicine in West Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın provinces. *J Ethnopharmacol.*, 53, 75-87 (1996).
- S. Kultur, Medicinal plants used in Kırklareli Province (Turkey). *J Ethnopharmacol.*, 111, 341-364 (2007).
- T. Baytop, Türkiye'de Bitkilerle Tedavi 2.nd Edn., Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, Turkey (1999).
- M. Blumenthal, A. Goldberg, J. Brinckmann, *Integrative Medicine Communications. Herbal Medicine.*, Newton, 359-366 (2000).
- E. Bombardelli, P. Morazzoni, *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia*, 66(1), 43-68 (1995).
- G. Di Carlo, F. Borrelli, E. Ernst, A.A. Izzo, St. John's wort: Prozac from the plant kingdom. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(6), 292-297 (2001).
- J. Bruneton, *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Lavoisier Publishing, Paris, 367-370 (1995).
- A.M. Gençler Özkan, B. Demirci, K.H.C. Baser, Essential Oil Composition of *Hypericum thymopsis* Boiss. *J. Essent. Oil Res.*, 21, 149-153 (2009).
- S. Erken, H. Malyer, F. Demirci, et al., Chemical Investigations On Some *Hypericum* Species Growing In Turkey-I. *Chem. Nat. Comp.*, 37(5), 434 - 438 (2001).
- B. Demirci, K.H.C. Baser, S.L. Crockett and I.A. Khan, Analysis of the Volatile Constituents of Asian *Hypericum* L. (Clusiaceae, Hyperidoideae) Species. *J. Essent. Oil Res.*, 17, 659-663 (2005).
- S. Crockett, B. Demirci, K.H.C. Baser and I.A. Khan, Volatile Constituents of *Hypericum* L. Section *Myriandra* (Clusiaceae): Species of the *H. fasciculatum* Lam. Alliance. *J. Essent. Oil Res.*, 20, 244-249 (2007).

DISTRIBUTION OF BIOACTIVE FLAVONOIDS IN *SIDERITIS* SPECIES USED FOR MEDICINAL “MOUNTAIN TEA” IN THE BALKAN COUNTRIES

Jasmina Petreska¹, Gjoshe Stefkov², Svetlana Kulevanova², Kalina Alipieva³, Vassya Bankova³, Marina Stefova¹

¹Institute of Chemistry, Faculty of Science Ss. Cyril and Methodius University, Skopje, Republic of Macedonia,

²Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy Ss. Cyril and Methodius University, Skopje, Republic of Macedonia,

³Institute of Organic Chemistry with Center of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

The genus *Sideritis* belongs to the Lamiaceae and comprises more than 150 species which are distributed in temperate and tropical regions of the Northern Hemisphere, from Bahamas to Western China

and from Germany to Morocco. Most species are mainly found in the Mediterranean area, from Canary Islands and Madeira to Caucasus; Spain and Turkey possess the highest number of different species. In the Balkan countries, the dried inflorescences of number of species of genus *Sideritis* L. are used to prepare traditional beverage so-called "Mountain tea". In R. Macedonia, these species are called "Sharplaninski čaj" or "Planinski čaj" and are widely used as a refreshing herbal tea. These species also have been studied and attributed to have anti-ulcer, anti-inflammatory and antioxidant activity [1-7]. Some of them are used in treatment of gastrointestinal ailments, common colds (including bronchitis, sore throat, and flu) and as a diuretic [2, 8]. Most of the studies on *Sideritis* species attribute these activities mainly to the flavonoids and the other phenolic compounds.

Twenty one sample of *Sideritis* species (*S. scardica*, *S. raeseri*, *S. taurica*, *S. syriaca* and *S. perfoliata*) from various sites on the Balkan Peninsula were evaluated for their chemical properties. Chemical analyses were focused on secondary metabolites, particularly flavonoids, which have several roles in the plant physiological processes and had demonstrated significant health beneficial effects. In the present work, flavonoids, both glycosides and aglycones, from several related *Sideritis* species from Balkan Peninsula have been studied, with HPLC coupled to UV-Vis diode array detection and mass spectrometry with electrospray ionization source (LC/DAD/ESI-MSⁿ) in order to establish a correlation between the taxonomy, geographical location and presence of the flavonoids.

A systematic method for flavonoids identification, using tandem mass spectrometry coupled to high performance liquid chromatography with diode array detection was developed. Scan for the precursor ions of commonly found phenolics in *Sideritis* species using LC/MSⁿ with an ion trap instrument allows for the specific determination of each category of acetylated and non-acetylated flavonoid glycosides. Further characterization of each flavonoid was performed using MS/MS product-ion analysis and common-neutral-loss analysis.

This on-line technique allowed identification of twenty five flavonoid glycosides, divided in three groups: flavonoid-7-*O*-glycosides, monoacetylated derivatives of flavonoid-7-*O*-diglycosides and diacetylated derivatives of flavonoid-7-*O*-diglycosides.

Flavonoid-7-*O*-allosyl(1→2)glucosides of isoscutellarein, hypolaetin, apigenin and 4'-*O*-methylisoscutellarein were identified in our samples. Only one monoglycoside compound as apigenin 7-*O*-glucoside was detected, whereas two compounds were characterized as apigenin 7-*p*-coumaroylglucoside.

Eleven compounds in *Sideritis* species could be characterized as monoacetylated derivatives of flavonoid-7-*O*-diglycosides. Eight of them were 6"-monoacetylated derivatives and for the other three the acetylation was at the 6" position. Only 5 diacetylated derivatives of 7-*O*-diglycosides were found in our samples.

The total amount of flavonoid-7-*O*-allosyl(1→2)glucosides ranged from 0.51 mg/g dry herba for *S. scardica* (Suva Gora Mtn., vil. Korito, R. Macedonia) to 10.61 mg/g dry herba for *S. raeseri* (Jablanica Mtn., R. Macedonia) representing up to 12.7 % of total phenolic compounds. The main flavonoid-7-*O*-allosyl(1→2)glucosides in all the species was isoscutellarein 7-*O*-allosyl(1→2)glucoside with the mean contribution of around 50 %. The flavonoid acetylglycosides group of components dominates with the highest content ranging from 13.10 mg/g dry herba in S15 (*S. raeseri*, Galicica Mtn., vil. Konjsko, R. Macedonia) up to 57.17 mg/g dry herba in S6 (*S. raeseri*, Galicica Mtn., Gjereka, R. Albania). To examine the ability of the variables obtained to determinate among *Sideritis* species, principal component analysis (PCA) was carried out,

for which standardized experimental data were considered. PCA showed great similarity between all *S. scardica* samples collected from all over R. Macedonia.

S. raeseri widely grows in Albania and Greece and at only few localities in R. Macedonia, both bordering Albania, representing the northern border of spreading areal of these taxa. PCA shows connection of Macedonian *S. raeseri* with *S. raeseri* growing Albanian mountains near Ionic See, as well as similarity between both *Sideritis* samples from south Albanian mountains.

REFERENCES

- Villar A, Gasco MA, Alcaraz MJ. (1984). Anti-inflammatory and anti-ulcer properties of hypolaetin-8-glucoside, a novel plant flavonoid. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 36, 820-823.
- Yesilada E, Honda G, Sezik E, Tabata M, Fujita T, Tanaka T, Takeda Y, Takaishi Y. (1995). Traditional medicine in Turkey V. Folk medicine in inner Taurus mountains. *Journal of Ethnopharmacology*, 46, 133-152.
- Gabrieli C, Kokkalou E, Niopas I. (1990). Anti-inflammatory activity of a novel glucosylated acylflavone from *Sideritis raeseri*. *Scientia Pharmaceutica*, 58, 395-397. <http://www.scopus.com/scopus/search/submit/author.url?author=Niopas%2c+&.origin=resultslist&authorId=7003399237&src=s>
- Rios JL, Mañez S, Paya M, Alcaraz M. J. (1992). Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. *Phytochemistry*, 31, 1947-1950.
- De Las Heras B, Vivas JM, Villar A. (1994). Anti-inflammatory activity of *Sideritis javalambrensis* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 41, 15-17.
- Koleva II, Linssen JPH., Van Beek TA, Evstatieva LN, Kortenska V, Handjieva N. (2003) Antioxidant activity screening of extracts from *Sideritis* species (Labiatae) grown in Bulgaria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 809-819.
- Tunalier Z, Kosar M, Ozturk N, Baser KHC. (2004). Duman, H., Kirimer, N. Antioxidant properties and phenolic composition of *Sideritis* species, *Chemistry of Natural Compounds*, 40, 206-210.
- Baytop, T. (1999). *Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present)*. Nobel Tip Publications, Istanbul, p.193.

РАСПРЕДЕЛБА НА БИОАКТИВНИ ФЛАВОНОИДИ ВО *SIDERITIS* ВИДОВИ КОИ СЕ КОРИСТАТ КАКО „ПЛАНИНСКИ ЧАЈ“ НА БАЛКАНСКИОТ ПОЛУОСТРОВ

Јасмина Петреска¹, Ѓоше Стефков², Светлана Кулеванова², Калина Алипиева³, Васја Банкова³, Марина Стефова¹

¹Институт за хемија, Природно-математички факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје, Република Македонија ²Институт за фармакогнозија, Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје, Република Македонија ³Институт за органска хемија со Центар за фитохемија, Бугарска академија на науките, Софија, Бугарија

Родот *Sideritis* припаѓа на фамилијата Lamiaceae и опфаќа повеќе од 150 видови кои се распространети во умерени и тропски области на северната хемисфера, од Бахамските острови до западна Кина и од Германија до Мароко. Повеќето видови главно се застапени во медитеранскиот регион, од Канарските острови и Мадера до Кавказ. Најголем број на различни видови растат во Шпанија и Турција. Во балканските земји, сувите надземни делови со соцветија на различните видови од родот *Sideritis* L се користат за подготовка на традиционална напиток т.н. „планински чај“. Во Република Македонија овие видови се нарекуваат „шарпланински чај“ или „планински чај“ и широко се користат како освежителен растителен чај. Овие видови биле предмет и на проучување на нивното дејство и им се припишува антиулцеративна, антиинфламаторна и антиоксидантна активност [1-7]. Некои видови се користат за

лекување ба гастроинтестинални заболувања, настинки (вклучувајќи и бронхитис, заболено грло, грип), и како диуретик [2, 8]. Најголем дел од истражувањата на *Sideritis* видовите ги припишуваат овие дејства главно на флавоноидите и другите фенолни соединенија. Дваесет и еден примерок од родот *Sideritis* и тоа: *S. scardica*, *S. raeseri*, *S. taurica*, *S. syriaca* и *S. perfoliata* од различни локалитети на Балканскиот полуостров беа проучувани со акцент на нивниот хемиски состав. Хемиските анализи беа фокусирани на секундарните метаболити, особено флавоноидите, кои имаат повеќе улоги во растителните физиолошки процеси од една страна, и потврдени корисни ефекти врз здравјето на човекот, од друга страна.

Во овој труд се проучувани флавоноидите и во нивната агликонска и во гликозидната форма од споменатите *Sideritis* видови од Балканскиот полуостров користејќи високоефикасна течна хроматографија поврзана со UV-Vis детектор со низа од диоди и масена спектрометрија со електроспреј јонизација (HPLC/DAD/ESI-MSⁿ) со цел да се утврди дали постои корелација помеѓу таксономијата, географската положба и присутните флавоноиди. Развиен и воспоставен е метод за идентификација на присутните флавоноиди користејќи тандем масена спектрометрија врзана со високоефикасна течна хроматографија. Следењето на прекурсор јоните на вообичаено среќаваните феноли во *Sideritis* видовите користејќи LC/MSⁿ со инструмент со јонска стапица (ion trap) овозможува специфично определување на секоја класа на ацетилирани и неацетилирани флавоноидни гликозиди. Натомашно то карактеризирање на секој флавоноид беше изведено користејќи анализа на MS/MS добиените јони (product-ions) и на неутралните загуби (neutral-loss).

Оваа on-line техника овозможи идентификација на дваесет и пет флавоноидни гликозиди поделени во три групи: флавоноид-7-*O*-гликозиди, моноацетилирани деривати на флавоноид-7-*O*-дигликозиди и диацетилирани деривати на флавоноид-7-*O*-дигликозиди. Флавоноид-7-*O*-алозил(1→2)глукозидите на изоскутелареин, хиполаетин и апигенин и 4'-*O*-метилизоскутелареин беа идентификувани во испитуваните примероци. Само еден моногликозид и тоа апигенин 7-*O*-глукозид беше детектиран, додека две компоненти беа карактеризирани како апигенин 7-*p*-кумароилглукозид.

Единаесет детектирани соединенија во *Sideritis* видовите беа окарактеризирани како моноацетилирани деривати на флавоноид-7-*O*-дигликозиди. Осум од нив беа 6'''-моноацетилирани деривати додека кај останатите три ацетилирањето беше во 6'' положба. Во нашите примероци беа најдени само пет диацетилирани деривати на 7-*O*-дигликозиди.

Вкупното количество на флавоноид-7-*O*-алозил(1→2)глукозиди се движеше од 0.51 mg/g дрога за *S. scardica* (Сува Гора, с. Корито, Р. Македонија) до 10.61 mg/g дрога за *S. raeseri* (Јаблица, Р. Македонија) што достигнува до 12.7 % од вкупните фенолни соединенија. Доминантен флавоноид-7-*O*-алозил(1→2)глукозид, со просечно 50 % удел од оваа група, во сите испитувани видови беше изоскутелареин 7-*O*-алозил(1→2)глукозид. Доминантна група на компоненти беше групата на флавоноидни ацетилглукозиди со највисока содржина во опсег од 13.10 mg/g сува дрога во *S. raeseri* (Галичица, с. Коњско, Р. Македонија) до 57.17 mg/g сува дрога во *S. raeseri*, Ѓерека, Албанија).

За да се провери способноста на добиените резултати за разграничување помеѓу различните *Sideritis* видови, беше употребена карактеристична векторска анализа (principal component analysis, PCA) на добиените податоци за видот и содржината на флавоноиди. Карактеристичната векторска анализа покажа голема

сличност помеѓу сите *S. scardica* примероци собрани од различни локалитети во Република Македонија. *S. raeseri* е широко распространет во Албанија и Грција и само на локалитети во Република Македонија на границата со Албанија, кои ја претставуваат северната граница на ареалот на распространетост на овој вид. Карактеристичната векторска анализа покажува поврзаност на македонскиот *S. raeseri* со *S. raeseri* кој расте на албанските планини близу Јонското Море, како и сличности со соодветните *Sideritis* примероци од јужните албански планини.

ЛИТЕРАТУРА

1. Villar A, Gasco MA, Alcaraz MJ. (1984). Anti-inflammatory and anti-ulcer properties of hypolaetin-8-glucoside, a novel plant flavonoid. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 36, 820-823.
2. Yesilada E, Honda G, Sezik E, Tabata M, Fujita T, Tanaka T, Takeda Y, Takaishi Y. (1995). Traditional medicine in Turkey V. Folk medicine in inner Taurus mountains. *Journal of Ethnopharmacology*, 46, 133-152.
3. Gabrieli C, Kokkalou E, Niopas I. (1990). Anti-inflammatory activity of a novel glucosylated acylflavone from *Sideritis raeseri*. *Scientia Pharmaceutica*, 58, 395-397. <http://www.scopus.com/scopus/search/submit/author.url?author=Niopas%2c1.&origin=resultslist&authorId=7003399237&src=s>
4. Rios JL, Marez S, Paya M, Alcaraz M. J. (1992). Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. *Phytochemistry*, 31, 1947-1950.
5. De Las Heras B, Vivas JM, Villar A. (1994). Anti-inflammatory activity of *Sideritis javalambrensis* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 41, 15-17.
6. Koleva II, Linssen JPH., Van Beek TA, Evstatieva LN, Kortenska V, Handjieva N. (2003) Antioxidant activity screening of extracts from *Sideritis* species (Labiatae) grown in Bulgaria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 809-819.
7. Tunali Z, Kosar M, Ozturk N, Baser KHC. (2004). Duman, H., Kirimer, N. Antioxidant properties and phenolic composition of *Sideritis* species, *Chemistry of Natural Compounds*, 40, 206-210.
8. Baytop, T. (1999). *Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present)*. Nobel Tip Publications, Istanbul, p.193.

ESSENTIAL OIL COMPOSITION OF MACEDONIAN JUNIPER (*JUNIPERUS COMMUNIS* L., CUPRESSACEAE)

Floresha Sela, Marija Karapandzova,
Gjoshe Stefkov, Svetlana Kulevanova

Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University "Ss Cyril and Methodius", Skopje, Republic of Macedonia

The spruce - juniper, (*Juniperus communis* L. (Cupressaceae) is a tree or a shrub with a wide range throughout the Republic of Macedonia. It grows in North and Central Europe and Asia. It represents a species with high climate edaphic amplitude that can be seen from large area of dispersal (1-3).

The juniper berry (*Juniperi fructus*) and cone leaves like needles (*Juniperi folium*) contain essential oils with characteristic conifer-like aroma and bitter taste (3-5). The juniper berry *Juniperi fructus* (*Baccae juniperi*) is an official drug according to the European and other pharmacopoeias. It is a natural raw material for distillation of juniper essential oil, as well as an official drug (*Juniperi aetheroleum*) according to the European Pharmacopoeia. The pharmaceutical use of the essential oil is of multi-purpose: diuretic, antiseptic, digestive, stomachic, antireumatic, etc. The berries are used traditionally to cure cystitis, digestive disorders, in therapy of chronic arthritis, and other indications. All of these activities refer to the components of the essential oil. The use of the spruce is high in pharmaceutical as well as in food industry, mainly as a spice and in the production of alcoholic beverages (for example, gin, French Genièvre, Slovak

Borovichka), than in the production of cosmetic and perfume production, and etc.

The amount and the composition of the essential oil of the juniper berries depend on the geographical background of the plant, the maturity of the plant, the age of the plant, the meteorological condition as temperature, exposure to the sun and the length of photoperiod, and other environmental factors (4-6). The juniper berries and the juniper essential oil are natural drugs that are exported from Republic of Macedonia, for years behind. Until now, there was no detailed study on the chemical composition which led to the goal of the present research - isolation of the essential oil from 15 samples the juniper berries from different locations in the Republic of Macedonia, determination of the chemical composition of the isolated essential oil and assessment of its quality according to the monograph of the European Pharmacopoeia (7).

The samples of the berries and the essential oils were labeled with marks JC1-JC15, depending on the location of the collection. All samples were collected in late autumn 2010. The essential oils were isolated by steam-distillation in the Clevenger apparatus. The chemical composition of the essential oils was determined using gas chromatography with mass spectrometry (GC/FID/MS).

The content of the essential oil in examined juniper berries was moving from 0.36-3.35 % (3.6-33.5 ml/kg, calculated on anhydrous drugs). The isolated oils were pale yellow liquids with characteristic conifer-like odor. Using method of GC/FID/MS 74 components were identified that represented 91.08 – 99.83% of the entire oils. Monoterpene components were presented in larger amounts in all samples of the oils in comparison to the sesquiterpenes (Fig. 1). Among mono and sesquiterpenes only small amounts of few others, non-terpene component, were identified, such as undecanone-2 and tricyclene.

Terpene hydrocarbons (THC) represented the most significant part of the oil in relation to oxidized terpene derivatives (TOD) (Fig. 2).

In the terpene hydrocarbons, predominated fraction was monoterpene hydrocarbons (MHC), presented as the most abundant fraction in all of the samples of isolated oils, ranging from 39.11% (JC13-1) to 73.38% (JC14-1) (Fig. 3).

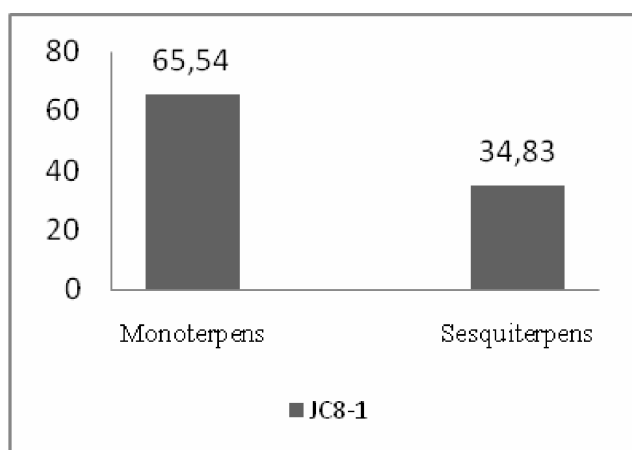


Fig. 1. Main fractions in investigated Juniper oils from Macedonian juniper

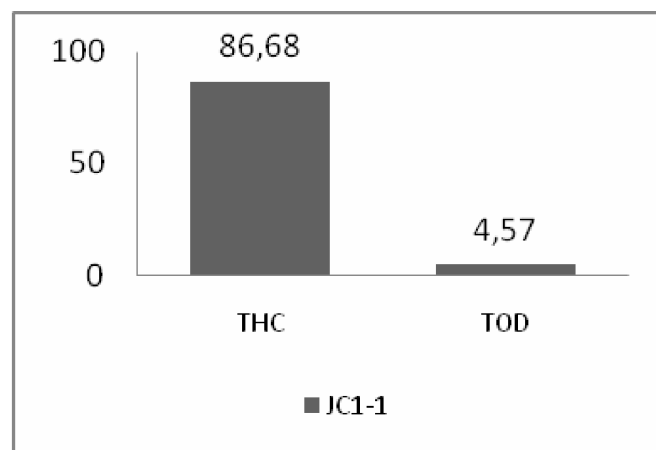


Fig. 2. Terpene hydrocarbons/terpene oxidized derivatives ratio in investigated Juniper oils of Macedonian juniper

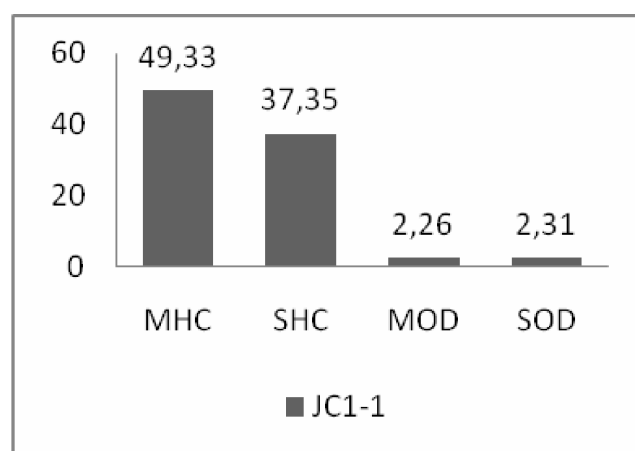


Fig. 3. The ratio of mono and sesquiterpene fractions in investigated Juniper oils of Macedonian juniper

In the fraction of monoterpene hydrocarbons dominated were: α -pinene 15.59% (JC9-1) – 43.19% (JC14), β -pinene 1.65% (JC9-1) – 5.35% (JC14), β -myrcene 2.89% (JC5-1) – 26.50% (JC6-1), sabinene 2.80 (JC5-1) – 11.77% (JC6-1), limonene 2.90 (JC4-1) – 4.46% (JC2-1). The oxidized monoterpene derivatives were presented only from 2.24% (JC3-1) – 8.00% (JC9-1), of the whole oil. The most abundant were terpene-4-ol, up to 6.32% (JC9-1) and α -terpineol from 0.18% (JC3-1) to 1.63% (JC3-1). The sesquiterpene hydrocarbons were presented from 17.45% (JC14-1) to 45.25% (JC14-1) of the entire oils. The dominant components were: germacrene D with 2.03% (JC14-1) to 10.22% (JC7-1); β -elemene from 1.43% (JC14-1) to 6.40% (JC7-1) and *trans*-(E)-caryophyllene with 1.8% (JC10-1) to 4.05% (JC5-1). The oxidized sesquiterpene derivatives appear with 0.59% (JC3-1) to 5.76% (JC13-1). The component α -cadinol dominated with 0.03% (JC4-1) to 1.13% (JC13-1) (in essential oil (JC4-1) was not identified). The mixture β -murolool+ β -cadinol were presented from 0.13% (JC9-1) to 1.74% (JC13-1).

In contrast to the monograph of Ph. Eur., significant differences were observed in the chemical composition of the essential oils obtained from the juniper berries from the Republic of Macedonia in relation to requests of European Pharmacopoeia

REFERENCES

1. Yarnell Eric, Botanical medicines for the urinary tract; World J Urol (2002) 20: p.285-293.
2. Thomas P.A., Bargathi M.E.L., Journal of Ecology (2007) 95,
3. Мицевски, Кирил ФЛОРА НА РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА. Т. 1, св. 4, Македонска академија на науките и уметностите, Скопје, 1998.
4. Peplnjak Stjepan, Kosalec Ivan, Kalodžera Zdenka, Blazević Nikola.; Antimicrobial activity of juniper berry essential oil; Acta. Pharm. 55 (2005) 417-422.
5. Orav A., Mihkel K., Kailas T., Müürisepp M., Comparative analysis of the composition of essential oils and supercritical carbon dioxide extracts from the berries and needles of Estonian juniper (*Juniperus communis* L.) Procedia Chemistry 2 (2010) 161-167.
6. Chatzopoulou P. et al.: Procedures influencing the yield and the quality of the essential oil from the *J.communis* L.berries, Acta Pharm.Helvetiae 70 (1995) 247-253
7. European Pharmacopoeia, 7th edition, Council of Europe, 2011.

СОСТАВ НА ЕТЕРИЧНО МАСЛО ОД МАКЕДОНСКА СМРЕКА (*JUNIPERUS COMMUNIS* L., CUPRESSACEAE)

Фљореша Сеља, Марија Карапанцова, Ѓоше Стефков, Светлана Кулеванова

Институт за фармакогнозија, Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје, Република Македонија

Смреката (*Juniperus communis* L. (Cupressaceae)) е дрво или грмушка широко распространета во Република Македонија. Расте во Северна и во Централна Европа и Азија. Претставува вид со голема климатска и едафска амплитуда што се гледа од ареалот на распространувањето (1-3).

Бобинките (*Juniperi fructus*) и игличките (*Juniperi folium*) содржат етерично масло со карактеристичен ароматичен мирис и горчлив вкус (3-5). *Juniperi fructus* (*Baccae juniperi*) е официнална дрога според европската и многу други фармакопеи. Претставува природна сировина за добивање на етеричното масло од смрека, исто така официнално според европската фармакопеја. Фармаколошката активност на маслото е повеќекратна: диуретик, антисептик, дигестив, стомак, антиреуматик и сл. Плодовите од смрека традиционално се користат при циститис, дигестивни проблеми, во терапија на хроничен артритис и други индикации, а дејството, меѓу другото, се припишува на компонентите од етеричното масло. Употребата на смрека е голема како во фармацевтската, така и во прехранбената индустрија, производството на алкохолните пијалаци (на пр. џин, French Genièvre, Slovak Borovitchka) во козметичкото и во парфимериското производство, итн.

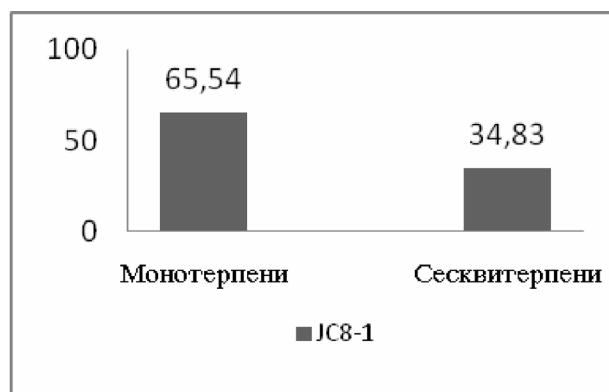
Содржината и составот на етеричното масло во бобинките од смрека зависи од географското потекло на растенијата, зрелоста и возраста, метеоролошките услови (температура, изложеноста на сонце, должината на фотопериодот) и од други надворешни фактори (4-6). Бобинките и етеричното масло од смрека се дроги што се извезуваат од Р. Македонија, години наназад. До сега не се подетално проучувани од каде што произлегува и целта на овој труд – изолација на етеричното масло од 15 примероци бобинки од смрека, од различни локалитети од Р. Македонија, опередување на хемискиот состав на изолираното масло и проценка на неговиот квалитет во споредба со барањата на монографијата на европската фармакопеја (7).

Примероците од бобинките и етеричните масла се означени со ознаките JC1- JC15, зависно од локалитетот на собирањето. Сите примероци се собрани во доцна есен, 2010 година. Етеричното

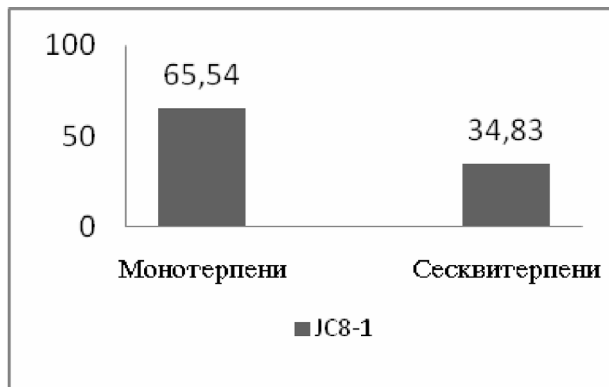
масло е изолирано со дестилација со водена пареа, во апарат по Кленцлер. Хемискиот состав на етеричните масла е определен со гасна хроматографија во спрега со масена спектрометрија (GC/FID/MS).

Содржината на етеричното масло во испитуваните бобинки од смрека се движи од 0,36-3,35 % (3,6-33,5 ml/kg, сметано на анхидрирана дрога). Во етеричното масло од смрека со метод на GC-MS идентификувани се вкупно 74 компоненти, кои што претставуваат од 91,08 - 99,83% од целокупното масло.

Доминантна фракција во сите масла е монотерпенската (Сл. 1), споредено со застапеноста на сесквитерпените. Покрај моно и сесквитерпените, само мали количества од други, нетерпенски компоненти како што се ундеканон-2 и трициклен, се идентификувани.



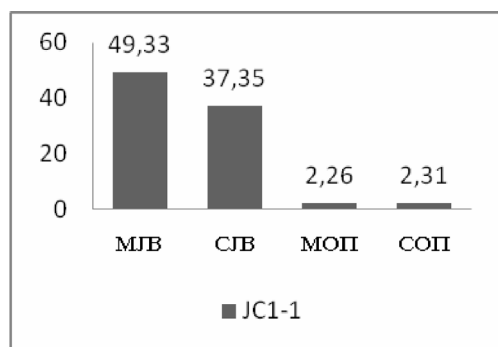
Сл. 1. Главни фракции во етерично масло од македонска смрека (примерок JC-8)



Терпенските јаглеводороди (ТЈВ) претставуваат значителен дел од маслото, во однос на терпенските оксидирани производи (ТОП) (Сл. 2).

Сл. 3. Терпенски јаглеводороди vs. терпенски оксидирани производи во етерично масло од македонска смрека (примерок JC-1)

Во делот од маслото што се состои од терпенски јаглеводороди, доминираат монотерпенските јаглеводородни соединенија (МЈВ), застапени од 39,11% (JC13-1) до 73,38% (JC14-1) (Сл. 3).



Сл. 1. Застапеност на посебни класи моно и сесквитерпени во етерично масло од македонска смрека (примерок JC-1)

Од монотерпенските јагледороди главни компоненти се: α -пинен од 15,59% (JC9-1) до 43,19% (JC-14); β -пинен од 1,65% (JC9-1) до 5,35% (JC-14), β -мирцен 26,50% (JC6-1) - 2,89% (JC5-1), сабинен од 2,80 (JC5-1) до 11,77% (JC6-1), лимонен од 2,90 (JC4-1) до 4,46% (JC2-1). Оксидирните монотерпенски производи се застапени од 2,24% (JC3-1) до 8,00% (JC9-1). Најзастапени се терпинен-4-ол од трагови (JC6-1) до 6,32% (JC9-1) и α -терпинеол од 0,18% (JC3-1) до 1,63% (JC3-1). Сесквитерпенските јагледороди се застапени со 17,45% (JC14-1) до 45,25% (JC14-1). Доминира гермакрен D со 2,03% (JC14-1) до 10,22% (JC4-1); γ -элемене од 6,40% (JC7-1) до 1,43% (JC14-1) и *trans*-(E)-кариофилен со 1,8% (JC10-1) до 4,05% (JC5-1). Оксидираните сесквитерпенски производи се јавуваат со 0,59% (JC3-1) до 5,76% (JC13-1). Доминираат α -кадинол со 0,03% (JC4-1) до 1,13% (JC13-1) (во етеричното масло (JC4-1) не е идентификуван). Смесата β -муролол+ α -кадинол е застапена од 0,13% (JC9-1) до 1,74% (JC13-1). Во споредба со монографијата на Ph. Eur. 7 забележани се значителни разлики во хемискиот состав на етеричното масло добиено од бобинките од македонската смрека, во однос на барањата на европската фармакопеја.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yarnell Eric, Botanical medicines for the urinary tract; World J Urol (2002) 20: p.285-293.
2. Thomas P.A., Bargathi M.El., Journal of Ecology (2007) 95,
3. Мицевски, Кирил ФЛОРА НА РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА. Т. 1, св. 4, Македонска академија на науките и уметностите, Скопје,1998.
4. Pepelnjak Stjepan, Kosalec Ivan, Kalodzera Zdenka, Blazevic Nikola.; Antimicrobial activity of juniper berry essential oil; Acta. Pharm. 55 (2005) 417-422.
5. Orav A., Mihkel K., Kailas T., M  urisep M., Comparative analysis of the composition of essential oils and supercritical carbon dioxide extracts from the berries and needles of Estonian juniper (*Juniperus communis* L.) Procedia Chemistry 2 (2010) 161-167.
6. Chatzapoulou P. et al.: Procedures influencing the yield and the quality of the essential oil from the *J.communis* L.berries, Acta Pharm.Helvetiae 70 (1995) 247-253
7. European Pharmacopeia, 7th edition, Council of Europe, 2011.

THE CONTENT OF MINERALS IN HERBS AND TEA-INFUSIONS OF MOUNTAIN TEA (*SIDERITIS SCARDICA* AND *SIDERITIS RAESERI*)

M. Spaseska¹, M. Karapandzova¹, B. Quazimi¹, G. Stefkov¹, T. Stafilov², K. Baceva², S. Kulevanova¹

¹Faculty of Pharmacy, University Ss Cyril and Methodius, Skopje, R. Macedonia

²Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University Ss Cyril and Methodius, Skopje, R. Macedonia

Dried over-ground parts of different species of *Sideritis*, such as *Sideritis scardica* Griseb. and *Sideritis raeseri* Boiss.&Heldr. (Lamiaceae), are well known herbs recognized as Mountain tea, Ironwort, Shepard's tea, Pirin tea or Sharplaninski caj. Both plants are very popular in Macedonia, Bulgaria, and Greece as well as throughout the Eastern Mediterranean as refreshment but also to cure common cold. The herbs are often used to prepare teas widely believed to alleviate sinus congestion, aches, pains and viruses including flu and common cold.

Species of genus *Sideritis* have been extensively investigated on chemical composition of flavonoids, phenylpropanoids, cinnamic acid derivatives and phenylethanoids (1) as well as on essential oils composition, chemistry of diterpenoids, iridoids and other terpenoids or related components (2). Recently, data on flavonoids, phenylethanoids and phenylpropanoid acids and their esters have been reported for native Macedonian *Sideritis* (*S. scardica* and *S. raeseri*) (3), as well as data on essential oil composition of the same species (4). Among plenty of data that considered the composition of different secondary metabolites, only few data dills with the content of minerals in these species originated from Serbia and Turkey (2, 5). There is no data on the minerals content in the Macedonian or Albanian species of *Sideritis*.

Plants, vegetables and fruits, but also herbs, especially the weedy ones, are mineral powerhouses. Getting minerals from normal diet or other sources is very important for building and functioning of human bodies. Minerals are critical building blocks needed for optimum functioning of the nervous system, the immune system, and all muscles, including the heart. The production of hormones also requires large amounts of minerals. Tea-infusions from medicinal plants, besides organic active compounds contain different amounts of minerals. Some of them are macro and micronutrients but tea-infusions may contain also heavy metals and toxic minerals. The potential contamination of herbs with toxic elements may be due to environmental pollution through industrial and automobile transport emission or to use of fertilizers and insecticides (6). The World Health Organization (WHO) has fixed maximum permissible levels in dry mass of medical plants for 3 toxic elements: arsenic, cadmium and lead (1.0, 0.3 and 10 mg/kg, respectively) (7).

Taking into account the consideration mentioned above, the aim of the present work was to obtain data for the content of some macro and micronutrients in the dry herbs of *Sideritis scardica* and *Sideritis raeseri* and in aqueous infusions of herbs used for preparation of refreshing and curative drinks in Macedonia and Albania. Besides, the content of some toxic elements in dry herbs and tea-infusions was determined also, in purpose of quality control of *Sideritis* specimens from Macedonia and Albania in relation to toxic and metal minerals. Twelve samples of *Sideritis scardica* collected on different localities from Macedonia and nine samples of *S. raeseri* collected from Mace-

donia and Albania were subjected to investigation. Plants were collected in flowering stage and dried in shadow. Microwave-assisted digestion of air-dried herbal mass was used for mineralization purposes. Herbal infusions were prepared from 2 g of dried herbs in 200 ml boiled water for 10 min and then filtered and evaporated on a hot plate almost to dryness. The residue was fully mineralized by HNO₃. A total of 20 elements were determined by use of inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES, Varian Model 715-ES, USA) and ETAAS on the Zeeman atomic absorption spectrometry (Varian SpectrAA 640Z).

The most abundant macronutrients in both *Sideritis* species were K and Ca, presented 6756-16213 mg/kg and 6363-10347 mg/kg, for *S. scardica* and *S. raeseri*, respectively. Lower amounts of P and Fe were followed by much lower amounts of Na. Interesting results were obtained for the content of Al, as samples of *S. raeseri* originated from Jablanica (S12) and Galicica (S15) as well as one sample from Albania (S7 – Gramoz) contained higher amount of Al, 657, 648 and 994 mg/kg, respectively. Aqueous infusions contained 49.5-89.1% of total K and 46-97% of total P, but smaller amounts of other macronutrients, ranging up to 28.2%, 43.0%, and 20.9% of total Ca, Mg and Fe, respectively (rarely more).

The contents of micronutrients in dried herbs of both *Sideritis* were variable for different elements and the most abundant was Zn (up to 48.6 mg/kg), Mn (up to 44.4 mg/kg in *S. scardica* and up to 40.6 mg/kg in *S. raeseri*), and B (up to 17.3 mg/kg and 20.0 mg/kg in both species, respectively). Larger amounts of Ba and Sr and lower amounts of Cu were registered also, and much lower amounts of Ni, Li, Cr and Co. Aqueous infusions contained up to 40% of total B, and up to 20%, 61.8%, 36%, 30% and 42.3% of total Ba, Cu, Mn, Sr and Zn, respectively. Toxic elements were presented in very low amounts in both species, ranging 0.01-0.59 mg/kg and 0.43-0.98 mg/kg for As for *S. scardica* and *S. raeseri*, respectively; from 0.31-3.16 mg/kg and 0.35-1.85 mg/kg for Cd and from 0.34-2.79 mg/kg and 0.35-2.49 mg/kg for Pb, for *S. scardica* and *S. raeseri*, respectively. While As and Cd were very poorly extractible with hot water, Pb was extracted more than 90% of total amounts of Pb in dried herbs of *Sideritis*.

REFERENCES

1. Koleva I.I., Linssen J.P.H., van Beek T.A., Evstatieva L.N., Kortenska V., Hadjieva N. (2003) Antioxidant activity screening of extracts from *Sideritis* species (Labiatae) grown in Bulgaria, *J Science of Food and Agriculture*, 83, 809-819.
2. Pljevljakusic D., Savikin K., Jankovic T., Zdunic G., Ristic M., Godjevac D., Konic-Ristic A. (2011) Chemical properties of the cultivated *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. subsp. *raeseri*, *Food Chemistry*, 124, 226-233.
3. Petreska J., Stefkov G., Kulevanova S., Alipieva K., Bankova V., Stefova M. (2011a) Phenolic compounds of Mountain tea from Balkans: LC/DAD/ESI/MSn profile and contents, *Natural Product Communications* 6, 1-10.
4. Kostadinova E., Nikolova D., Alipieva K., Stefova M., Stefkov G., Evstatieva I., Matevski V., Bankova V. (2007) Chemical constituents of essential oils of *Sideritis scardica* Griseb. and *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. From Bulgaria and Macedonia, *Natural Product Research*, 21 (9), 819-823.
4. Mehmet Musa Ozcan, Ahmet Unver, Tolga Ucar, Derya Arslan (2008) Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction, *Food Chemistry*, 106, 1120-1127.
5. Gosslin R.E., Smith R.P., Hodge H.C., Braddock L.E. (1984) *Clinical toxicology of commercial products*, Fifth ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
6. Gentscheva G., Stafilov T., Ivanova E.H. (2010) Determination of some essential and toxic elements in herbs from Bulgaria and Macedonia using atomic spectrometry, *Euroasian Journal of Analytical Chemistry* 5(2), 104-111.

СОДРЖИНА НА МИНЕРАЛИ ВО ХЕРБА И ВО ИНФУЗ ОД ПЛАНИНСКИ ЧАЈ (*SIDERITIS SCARDICA* И *SIDERITIS RAESERI*)

М. Спасеска¹, М. Карапанцова¹, Б. Казими¹,
Ѓ. Стефков¹, Т. Стафилов², К. Бачева²,
С. Кулеванова¹

¹Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, Р. Македонија

²Природно-математички факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, Р. Македонија

Исушени надземни делови од различни видови од *Sideritis*, како што се *Sideritis scardica* Griseb. и *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae), се познати како Планински, Ironwort, Shepard's tea, Пирински и Шарпланински чај. Двете растенија се многу популарни во Македонија, Бугарија, Грција и во источните делови од Медитеранот, како освежувачи, но исто така и за лекување на настинка. Се користат за подготвување на чајни напивки и се смета дека ублажуваат конгестивен синусит, болка, вирусни вклучувајќи настинка и грип и др.

Видови од родот *Sideritis* интензивно се испитувани во однос на застапеноста на одредени хемиски компоненти како што се флавоноиди, фенилпропаноиди, деривати на циметна киселина, фенилетаноиди (1), дитерпени, иридоиди и други слични компоненти, како и во однос на состав на етерично масло (2). Неодамна, податоци за флавоноиди, фенилетаноиди и феилпропаноидни киселини и нивните естри се објавени за афтохтони видови *Sideritis* од Македонија (*S. scardica* and *S. raeseri*) (3), како и податоци за составот на етерично масло од истите два вида *Sideritis* (4). Во литература може да се најдат многу податоци за различни секундарни метаболити, но има само неколку наводи за минералниот состав на видовите *Sideritis* што потекнуваат од Србија и Турција (2, 5). Што се однесува до минералниот состав на *Sideritis* видовите од Македонија и Албанија нема податоци.

Растенијата, зеленчукот, овошјето како и лековитите растенија претставуваат извори на минерали. Внесување на минерали преку секојдневна исхрана или некои други извори е многу важно за градење и функционирање на човековиот организам. Минералите се потребни за оптимално функционирање на нервниот систем, имунолошкиот систем, и сите мускули вклучувајќи го и срцето. Создавањето на хормони, исто така, бара внесување на голема количина на минерали. Инфузите од лековити растенија покрај органските активни состојки содржат и различни минерали. Некои од нив се макро и микронутриенти но исто така чајната напивка може да содржи тежки метали и токсични минерали. Потенцијалната контаминација на лековити растенија со токсични елементи може да се должи на индустриското загадување на животната средина, автомобилските издувни гасови или на употреба на ѓубрива и на инсектициди (6). Светската здравствена организација (СЗО) има пропишано максимално дозволени граници за застапеност на три токсични елементи сметано на сува маса на растителен материјал: арсен, кадмиум и олово (1,0; 0,3 и 10 mg/kg, соодветно) (7).

Земајќи го предвид горе наведеното, целта на овој труд е да се добијат податоци за содржината на некои макро и микронутриенти во херби од *Sideritis scardica* и *Sideritis raeseri*, како и во водени инфузи што се користат како освежителни и лековити напивки во

Македонија и Албанија. Покрај тоа, определена е соржината на некои токсични елементи во суви херби и инфузи, со цел контрола на квалитетот на примероците од *Sideritis* од Македонија и Албанија во однос на токсичните и металните минерали.

Испитувани се дванаесет примероци од *Sideritis scardica* собрани на различни локалитети од Македонија и девет примероци на *S. raeseri* собрани во Македонија и во Албанија. Растенијата се собираат во фаза на цветање и се сушени во сенка. За минерализација на растителен материјал е користена постапка со микробранова дигестија. Подготвени се и инфузи од 2 g исушен растителен материјал прелиен со 200 ml зовриена вода во време од 10 min, филтрирано и упарено до суво во порцелански здели. Остатокот е целосно минерализиран со HNO₃. Со примена на атомска емисиона спектрометрија со индуктивно спрегната плазма (ICP-AES, Varian модел 715-ES, САД) и Zeeman-ова електротермичка атомска апсорпциона спектрометрија (Varian SpectrAA 640Z), определени се вкупно 20 елементи. Најзастапени макронутриенти во двета вида *Sideritis* се К и Са, застапени во количини 6756-16213 mg/kg и 6363-10347 mg/kg, за *S. scardica* и *S. raeseri*, соодветно. Определени се ниски содржини на Р и Fe, како и уште пониски на Na. Интересни резултати се добиени за содржината на Al, во примероците од *S. raeseri* кои потекнуваат од Јабланица (S12) и Галичица (S15), како и еден примерок од Албанија (S7-Грамос) каде што содржината на Al изнесува 657, 648 и 994 mg/kg, соодветно. Инфузите содржат 49,5-89,1% од вкупниот К и 46-97% од вкупниот Р, и помали количества на други макронутриенти (до 28,2%, до 43,0%, до 20,9% од вкупниот Са, Mg и Fe, соодветно, ретко повеќе).

Содржината на макронутриенти во хербите од двета вида *Sideritis* е променлива за различни елементи при што најзастапени се Zn (до 48,6 mg/kg), Mn (до 44,4 mg/kg во *S. scardica* и до 40,6 mg/g во *S. raeseri*) и В (до 17,3 mg/kg и 20,0 mg/kg во двета вида, соодветно). Определени се поголеми содржини на Ва и Sr и пониски содржини на Cu, како и многу пониски содржини на Ni, Li, Cr и Co. Инфузиите содржат до 40% од вкупен В, и до 20%, 61,8%, 36%, 30% и 42,3% од вкупните Ва, Cu, Mn, Sr и Zn, соодветно.

Содржината на токсични елементи се движи во многу мали граници и во двета вида изнесува: за As 0,01-0,59 mg/kg и 0,43-0,98 mg/kg, за *S. scardica* и *S. raeseri*, соодветно, односно, 0,31-3,16 mg/kg и 0,35-1,85 mg/kg за Cd и 0,34-2,79 mg/kg и 0,35-2,49 mg/kg за Pb, за *S. scardica* и *S. raeseri*, соодветно. За разлика од As и Cd кои многу слабо се екстрахираат со зовриена вода, во најголем број случаи Pb се екстрахира повеќе од 90% од вкупната застапеност во хербата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Koleva I.I., Linssen J.P.H., van Beek T.A., Evstatieva L.N., Kortenska V., Hadjieva N. (2003) Antioxidant activity screening of extracts from *Sideritis* species (Labiateae) grown in Bulgaria, *J Science of Food and Agriculture*, 83, 809-819.
2. Pljevljakusic D., Savikin K., Jankovic T., Zunic G., Ristic M., Godjevacki D., Konic-Ristic A. (2011) Chemical properties of the cultivated *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. subsp. *raeseri*, *Food Chemistry*, 124, 226-233.
3. Petreska J., Stefkov G., Kulevanova S., Alipieva K., Bankova V., Stefova M. (2011a) Phenolic compounds of Mountain tea from Balkans: LC/DAD/ESI/MSn profile and contents, *Natural Product Communications* 6, 1-10.
4. Kostadinova E., Nikolova D., Alipieva K., Stefova M., Stefkov G., Evstatieva I., Matevski V., Bankova V. (2007) Chemical constituents of essential oils of *Sideritis scardica* Griseb. and *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. From Bulgaria and Macedonia, *Natural Product Research*, 21 (9), 819-823.
5. Mehmet Musa Ozcan, Ahmet Unver, Tolga Ucar, Derya Arslan (2008) Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction, *Food Chemistry*, 106, 1120-1127.
6. Gosselin R.E., Smith R.P., Hodge H.C., Braddock L.E. (1984) *Clinical toxicology of commercial products*, Fifth ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
7. Gentscheva G., Stafilov T., Ivanova E.H. (2010) Determination of some essential and toxic elements in herbs from Bulgaria and Macedonia using atomic spectrometry, *Euroasian Journal of Analytical Chemistry* 5(2), 104-111.

ANTIDIABETIC AND ANTILIPIDEMIC PROPERTIES OF *CENTAURIM ERYTHREA* L. (GENTIANACEAE)

Gjoshe Stefkov¹, Biljana Miova², Suzana Dinevska-Kjovkarovska², Jasmina Petreska², Marina Stefova², Gordana Petrusevska³, Svetlana Kulevanova¹

¹Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17 Str., 1000 Skopje, Macedonia

²Faculty of Natural Sciences, P.O.Box 162, 1001 Skopje, Macedonia

³Faculty of Medicine, Vodnjanska 17 Str., 1000 Skopje, Macedonia

The aim of this study was to gain insight into the underlying biochemical mechanism of action of the antidiabetic and antilipidemic activities of the dry extract of *Centaureum erythraea* L., widely growing in the Republic of Macedonia. The extraction of the aerial parts of the dried plant was performed by the maceration in methanol with ultrasonic agitation (USA extraction), than freeze-dried, which resulted in 23,1% dry extract (CE) yield. HPLC-DAD-ESI-MS analyses revealed presence 4 different secoiridoides, 7 flavonoid heterosides и 7 xantones representing 53%, 25% and 22% of all compounds, respectively.

Further, their effect on blood glucose and lipids was tested in normo- and streptozotocin STZ hyperglycemic rats. The short term-12 days-treatment of the STZ-diabetic rats with CE-extracts resulted with 74% reduction of the produced hyperglycaemia, which is only 6% less than the reduction caused by glibenclamide (GLB), as a positive control.

Liver gluconeogenic enzyme activities and levels of intermediates in the carbohydrate metabolism were also measured.

The CE-extract had a significant impact on the hepatic carbohydrate metabolism, enhancing the direct synthesis of glycogen and reducing the activity of glucose-6-phosphatase, which further causes reduction of production of blood glucose level. Glycogen accumulation in the hepatocytes was also confirmed with histomorphological analyses.

The assessment of the effects after long-term-42 days CE-treatment leads to conclusion that the blood glucose regulation is most evident at the beginning of the experiment, decreasing up to the end of the experiment. It is important to stress that the HbA1c in CE-treated group of animals was even lower than in the GLB-treated groups.

The obtained results indicates that long-term treatment with CE extract in STZ diabetic rats has a positive influence and regulate the elevated level of glucose in the blood, which is slightly better than the effect of glibenclamide.

Since we made identification of three groups of compounds in the CE-extract, it is most obviously that all of them (bitter iridoides and xantones, which cause pancreatic and stomach gland stimulation, and flavonoides) probably have influence on the expressed antihyperglycaemic effect.

The antilipidemic assessment of the CE-extract revealed no significant changes on the lipid status (total cholesterol, triglycerides, HDL and LDL level in the blood) of the treated normal and STZ hyperglycemic rats.

The results demonstrate that dry extracts of the aerial parts of *Centaureum erythraea*, contain flavonoids, xantones and iridoides with antihyperglycemic effects when administered to rats.

АНТИДИЈАБЕТИЧНИ И АНТИ- ЛИПИДЕМИЧНИ ЕФЕКТИ НА *CENTAURIM ERYTHREA L. (GENTIANACEAE)*

Ѓоше Стефков¹, Биљана Миова², Сузана Диневска-
Ќовкарговска², Јасмина Петреска², Марина
Стефова², Гордана Петрушевска³,
Светлана Кулеванова¹

¹Фармацевтски факултет, Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија

²Природно-математички факултет, Гази баба бб, 1001 Скопје, Р.
Македонија

³Медицински факултет, Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија

Цел на оваа студија е да се добијат сознанија за основните биохемиски, антидијабетични и антилипидемични ефекти на сув екстракт добиен *Centaurium erythrea L.*, (диво-растечко растение од Р.Македонија). Извршена е краткотрајна метанолна екстракција со ултрасонична агитација (USA екстракција) на суви надземни делови на испитуваното растение. Екстрактот (СЕ) потоа беше лиофилизиран и измерениот принос на сувиот екстракт изнесуваше 23,1%. Со HPLC-DAD-ESI-MS анализите беа идентификувани 4 секоиридоиди, 7 флавоноидни хетерозиди и 7 ксантони, застапени со 53%, 25% и 22%, соодветен сооднос сите компоненти во сувиот екстракт.

Порценката на антидијабетичниот ефект на СЕ-екстрактот беше направена врз основа на испитувањата на активноста/концентрација на клучните хепатални ензими/субстрати од јаглехидратниот метаболизам и преку концентрацијата на глукозата и липидниот статус кај здрави и стрептозотоцин- (STZ) дијабетични стаорци. Краткотрајниот (12-дневен) третман на STZ-дијабетичните стаорци резултираше со 74% редукција на продуцираната хипергликемија, што е за само 6% пониска од редукцијата на хипергликемијата предизвикана од третманот со глибенкламид (GLB), како позитивна контрола.

Сувиот екстракт од СЕ предизвика значајни промени на ниво на хепаталниот јаглехидратен метаболизам, интензивирајќи ја директната синтеза на гликоген и намалувајќи ја активноста на глукоза-6-фосфатазата, со што доаѓа до намалување на продукцијата на циркулаторна глукоза. Хистоморфолошките анализи на црниот дроб исто така укажаа на акумулација на гликоген во хепатоцитите. Од долготрајниот експеримент (42 дена) за проценка на ефектите од хроничен третман со СЕ (250 mg/kg) може да се заклучи дека ефектите врз регулацијата на нивото на глукоза кај дијабетичните животни се најголеми на почетокот на експериментот, за да постепено се намалуваат кон крајот на истиот. Значајно е да се нагласи дека вредноста за HbA_{1c} кај СЕ групата е пониска и од средната вредност измерена во групата третирана со глибенкламид (позитивна контрола).

Ова укажува на фактот дека подолготраен третман со екстрактот СЕ кај дијабетични животни позитивно влијае и го регулира покаченото ниво на глукоза во крвта, што во овој случај е подобро отколку регулацијата со глибенкламид.

Од сите анализирани податоци и резултати, во екстрактот од *Centaurium erythrea L.* идентификувавме три групи на компоненти и многу веројатно е дека сите три (горчливите иридоиди, кои предизвикуваат стимулација на стомачните жлезди, вклучително и на панкреасот, ксантоните и флавоноидните компоненти) се одговорни за неговиот позитивен антихипергликемичен ефект.

Од проценката на антилипидемичниот ефект на СЕ, може да се заклучи дека истиот нема влијание на липидниот статус (вкупен холестерол, триглицериди и липопротеините со висока и ниска густина) кој остана скоро непроменет за време на испитувањата, како кај здравите, така и кај STZ-дијабетичните стаорци.

Добиените резултати укажуваат дека сувиот екстракт од *Centaurium erythrea*, содржи флавоноиди, ксантони и иридоиди, што покажаа антихипергликемичен ефект при *in vivo* администрација кај здрави и дијабетични стаорци.

ESSENTIAL OIL COMPOSITION OF WILD GROWING SAGE FROM R. MACEDONIA

Gjoshe Stefkov¹, Ivana Cvetkovikj², Marija Karapandzova¹, Valbona Krluku¹, Svetlana Kulevanova¹

¹Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University "Ss. Cyril and Methodius", Skopje, Macedonia.

²Department of Natural Products and Biotechnology, Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Mediterraneennes, Mediterranean Agronomic Institute of Chania, Crete, Greece.

INTRODUCTION

Genus *Salvia* has medicinal and horticultural importance as they produce many useful natural constituents including terpenes and flavonoids (Kelen and Tepe, 2007). They are counted as one of the largest members of the Lamiaceae or mint family that includes around 900 species and has an almost cosmopolitan distribution (Mediterranean, Asia Minor, Central Europe and America etc.).

"Sage", the dialect name of the genus *Salvia* is attributed to different species from these groups that are widely used in the food, drug and fragrance industry. The high diversity in their secondary metabolites (essential oils and the phenolic derivatives) isolated from sage plants, even today shown excellent antimicrobial activity as well as antioxidant capacity and some are used as anticancer agents or have hypoglycemic effect (Kintzios, 2000). Several species of *Salvia* including *S. officinalis* (*S. officinalis* folium) and *S. triloba* (*S. triloba* folium) can be found in many pharmacopeias (Flamini *et al.*, 2005). Although sage is an ancient spice and remedy, its importance today is quite limited to the Mediterranean countries (starting from Italy till Greece).

The Macedonian flora includes 37 species of this genus. Of the many existing *Salvia* species, *Salvia officinalis* also known as "Dalmatian sage" or "Garden sage", has economic importance and can be used for preparation of various herbal remedies and extracts with antiseptic and antibacterial properties which are attributed to the rich chemical content of the essential oil and proven by the modern medical science. Up to present there are no evident data about essential oil composition of *S. officinalis* populations growing in Republic of Macedonia. The importances of *S. officinalis* draw our attention to examine and identify the active ingredients of the essential oils obtained by hydrodistillation of the sage leaves collected from R. Macedonia.

MATERIALS AND METHODS

The Plant material from three different populations was harvest from Karaorman Mtn., Galicica Mtn., and Jablanica Mtn., located in the

western part of Macedonia, nearby the Albanian border, during June 2009/10. The leaves were air dried and stored until distillation. Essential oil isolation from sage leaves was performed by hydrodistillation in all-glass Clevenger apparatus (Ph. Eur.7). The samples were analyzed on Agilent 7890A Gas Chromatography system equipped with FID detector and Agilent 5975C mass spectrometer. HP-5ms 5% phenyl 95 % dimethylpolysiloxane bonded phase capillary column (30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 mm) was used. Operating conditions were as follows: oven temperature at 60 °C for 5 min, then increased to 80 °C at rate of 1 °C/min and held 2 min and at the end increased to 280 °C at rate of 5 °C/min and held 5 min; helium as carrier gas at a flow rate of 1ml/min; temperature of the injector 260 °C and that of the FID detector 270 °C; the GC split ratio 1:1. 1ml of each sample was injected per GC run. The mass spectrometry conditions were: ionization voltage 70 eV, ion source temperature 230 °C, transfer line temperature 280 °C and mass range from 50 - 500 Da. The MS was operated in scan mode.

Results and discussion: Sixty three components (37 monoterpenes, 17 sesquiterpenes, 5 diterpenes and 4 other components) were identified in the essential oil from Galicica population, fifty seven (34 monoterpenes, 12 sesquiterpenes, 5 diterpenes and 6 other constituents) from Globocica and fifty one from Karaorman (27 monoterpenes, 13 sesquiterpenes, 5 diterpenes and 6 other components- aromatic and aliphatic hydrocarbons, esters and etc). The most abundant constituents were the terpene hydrocarbons, encompassing the monoterpenes: camphor (13.151 - 25.907%), α -thujone (19.246 - 26.327%), β -thujone (2.033 - 5.275%), 1,8-cineole (6.508 - 13.603%), α -pinene (0.93 - 1.472%), borneol (1.073 - 4.673%), the sesquiterpenes: *trans* (E)-caryophyllene (1.716 - 5.332%), α -humulene (2.893 - 7.987%), viridiflorol (4.273 - 7.987%), and the diterpene: manol (2.125 - 3.792%). Camphor was the predominant compound in the essential oils of Galicica and Globocica populations, and β -thujone in the samples from Karaorman. These results are comparable with the data listed for sage essential oils where the analysis shows that the major constituent is thujone (35 to 60%) in two epimeric forms, the β -form of this keton is present from 22.2 to 36.8% while α -thujone from 4.0 to 27.5%. The average distribution of the other components is 18% camphor, 16% borneol, 15% 1,8-cineol, 4.4% α -pinene, and 3.5% β -pinene (Hager, 2006, Ignea *et.al.*, 2011, Avato *et.al.*, 2005, Maksimovic *et.al.*, 2007).

CONCLUSION

The qualitative essential oil composition extracted from *S. officinalis* populations from R. Macedonia corresponds to the essential oil components of Dalmatian sage.

REFERENCES

- Avato P., Fortunato I.M., Ruta C., D'Elia R., (2005): Grandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L., *Plant Science*, Vol.169, pp.29-36.
- Flamini G., Cioni P.L., Morelli I., Bader A., (2007): Essential oils of the aerial parts of three *Salvia* species from Jordan: *Salvia lanigera*, *S. spinosa* and *S. syriaca*, *Food Chemistry*, Vol.100, pp.732-735.
- Hager, (2006): Hagers Handbuch der drogen und Arzneistoffe, Springer.
- Ignea C., Cvetkovikj I., Loupassaki S., Kefalas P., Johnson C.B., Kampranis S.C., Makris A.M., (2011): Improving yeast strains using recyclable integration cassettes for the production of plant terpenoids, *Microbial Cell Factories*, Vol.10, No.4.
- Kelen M., Tepe B., (2007): Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species

from Turkish flora, *Bioresource Technology*.

Kintzios S.E., (2000): Sage: the genus *Salvia*, Australia: Harwood Academic, Abingdon: Marston.

Maksimovic M., Vidic D., Milosh M., Sholic M.E., Abadzic S., Siljak-Yakovlev S., (2007): Effect of the environmental conditions on essential oil profile in two Dinaric *Salvia* species: *S. brachyodon* Vandas and *S. officinalis* L., *Biochemical systematic and ecology*, Vol.35, pp.473-478

THE CONTENT OF MACRO AND MICRONUTRIENTS IN DRIED NEEDLES AND BRANCHES OF MACEDONIAN PINE (*PINUS PEUCEGRISEB.*, PINACEAE) V.S. THEIR CONTENT IN THE PLANT RESIDUE AFTER DISTILLATION OF ESSENTIAL OIL

Marija Karapandzova¹, Gjose Stefkov¹, Trajče Stafilov², Katerina Bačeva², Svetlana Kulevanova¹

¹ Institute of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University "Ss. Cyril and Methodius", Skopje, Macedonia

² Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University "Ss. Cyril and Methodius", Skopje, Macedonia

The growth and development of plants depend to a large extent on the physical-chemical characteristics of the soil, as well as availability of nutrients and their ration. Plants assimilate nutrients selectively and according to biological needs. All of them are necessary and none can be replaced by some other elements as each element has its own functions (1). There are two defined criteria for an element to be essential for plant growth: in its absence the plant is unable to complete a normal life cycle or the element is part of some essential plant constituent or metabolite (2). Nineteen chemical elements are known to be important for a plant's growth and survival. These elements are divided into two main groups: non-mineral and mineral. The non-mineral nutrients are hydrogen, oxygen and carbon and are found in the air and water. In a process called photosynthesis, plants convert carbon dioxide (CO₂) and water (H₂O) into starch and sugar which are indicate as plant's food. The 13 mineral nutrients, which come from the soil, are dissolved in water and absorbed through a plant's roots. There are not always enough of these nutrients in the soil for a plant to grow healthy thus the reason why many farmers and gardeners use fertilizers to add the nutrients to the soil. The mineral nutrients are divided into macro and micronutrients. Macronutrients can be primary (nitrogen, phosphorus and potassium) which are usually lacking from the soil because plants use large amounts of these elements for their growth and survival and secondary (calcium, magnesium and sulfur) which are usually found in enough amounts especially sulfur. This macronutrient generates from slow decomposition of soil organic matter, an important reason for not throwing out grass clippings and leaves. Micronutrients (boron, copper, iron, chlorine, manganese, molybdenum, zinc, nickel, selenium and sodium) are essential for plant growth and are needed in very small (micro) quantities. These elements are known as minor or trace elements (2, 3). While the macronutrients are present in plant tissue in quantities

from 0.2% to 4.0% (on a dry matter weight basis), micronutrients are present in quantities less than 0.02% (2).

Recycling organic matter such as grass clippings and tree leaves is an excellent way of providing micronutrients (as well as macronutrients) to growing plants. On the other hand, a number of studies have been carried out on the utilization of wood ash in agriculture and forestry as an alternative method for disposal. Wood ash as an excellent source of potassium, lime and other elements (calcium, magnesium, manganese, aluminium, phosphorous, sulfur, iron, sodium, zinc) can be used either as a soil amendment in agriculture or to correct forest nutrient deficiencies or unbalances (4).

Based on all of the previously mentioned, the aim of this study was to obtain data for the plant nutrients content in *Pinus peuce* dried needles and branches v.s. their content in the plant residue after distillation of essential oil in order to use them as natural fertilizer.

Plant material was collected on three different localities in R. Macedonia (Pelister, Shara Mtn. and Nidze Mtn.), in June 2009.

0.5 g of dried and minced needles, branches with needles and branches without needles were placed in Teflon digestion vessels. 8 ml concentrated nitric acid and 2 ml H₂O₂ (30 %, m/V) were added, and the vessels were capped closed, tightened and placed in the rotor of the Marsx microwave digestion (CEM, USA) for mineralization. Finally, the vessels were cooled, carefully opened, and digests were quantitatively transferred to 25 ml calibrated flasks. The investigated 20 elements (Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Sr, V, Zn) were analyzed by atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma, AES-ICP (Varian, Model 715-ES, USA). Determination of N was carried out according to the Kjeldahl method using 1 g of plant material.

Among 20 investigated elements, the most abundant macronutrients in the *Pinus peuce* needles, branches with needles and branches without needles were potassium (2084-4277 mg/kg) and calcium (1240-2007 mg/kg). The plant residues after distillation of the essential oil contain smaller amounts of potassium and larger amounts of calcium (estimated on dried mass), which is probably due to the differences in elements solubility in hot water during the process of distillation. The magnesium and phosphorus content ranges from 454-696 mg/kg and 497-1364 mg/kg, respectively, and is diminished in the dried plant residue after distillation, while the presence of nitrogen ranges from 7420 to 18340 mg/kg and is generally present in the same quantities as it was in starting plant material.

The trace elements that were analyzed were nickel (0.38-9.22 mg/kg), copper (2.11-29.49 mg/kg), sodium (2.74-109.71 mg/kg), manganese (17.55-144.0 mg/kg), zinc (26.81-45.01 mg/kg), iron (34.92-121.45 mg/kg) and boron (37.57-101.21 mg/kg). The content of nickel, copper and sodium in dried plant residue after distillation of essential oil is smaller in comparison with starting material, while iron, zinc and boron are generally present in larger amount. In the most cases, the manganese content is changed depending on the locality and on plant material. According to literature data, aluminium is important as wood ash element (4), although it isn't considered as micronutrient. The content of aluminum in the dried plant material ranges from 47-544 mg/kg and is mostly present in the larger amount in the plant residue after distillation of essential oil.

Investigated plant material (needles, branches with needles and branches without needles from *Pinus peuce*) is a source of macro and micronutrients that are necessary for growth and development of plants, thus the material that remains after distillation of essential oil can be interesting for consideration towards its utilization as natural fertilizer.

REFERENCES

1. Kuznetsova T, Mandre M. (2005) Mineral composition of lodgepole pine (*Pinus conorta* var. *latifolia* Englem) on exhausted oil shale opencast mines. *Forestry studies*, 42:105-115.
2. http://en.wikipedia.org/wiki/Plant_nutrition
3. <http://www.ncagr.gov/cyber/kidswrld/plant/nutrient.htm>
4. Liodakis S, Katsigiannis G, Lymperopoulou T. (2007) Ash properties of *Pinus halepensis* needles treated with diammonium phosphate. *Thermochemica Acta*, 453:136-146.

СОДРЖИНА НА МАКРО И МИКРОНУТРИЕНТИ ВО ИГЛИЧКИ И ВО ГРАНКИ ОД МОЛИКА (*PINUS PEUCE GRISEB., PINACEAE*) ПРЕД И ПО ДЕСТИЛАЦИЈА НА ЕТЕРИЧНО МАСЛО

Марија Карапанцова¹, Ѓоше Стефков¹, Трајче Стафилов², Катерина Бачева², Светлана Кулеванова¹

¹Институт за Фармакогнозија, Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје, Македонија

²Институт за Хемија, Природно-математички факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје, Македонија

Растот и развојот на растенијата во голема мера зависи како од физичко-хемијски карактеристики на почвата, така и од достапноста на хранливите материи и нивниот сооднос. Растенијата селективно ги асимилираат нутриентите во согласност со нивните биолошки потреби. Сите тие се неопходно потребни и ниту еден од нив не може да биде заменет со друг, бидејќи секој елемент има своја засебна функција (1). Постојат два дефинирани критериуми според кои елементите се сметаат за неопходни за раст на растенијата: во нивно отсуство, растението не може да остварува нормален животен циклус или елементот е составен дел на определени компоненти или метаболити битни за растението (2). Денес се познати деветнаесет хемијски елементи важни за растот и за опстанокот на растенијата. Овие елементи се поделени во две групи: не-минерални и минерални. Во групата на не-минерални нутриенти спаѓаат водород, кислород и јаглерод и истите се наоѓаат во воздухот и во водата. Во процесот на фотосинтеза, растенијата го преведуваат јаглеродениот диоксид (CO₂) и водата (H₂O) во скроб и шеќер кои се сметаат за основна растителна храна. Останатите 13 минерални нутриенти, што ги има во почвата, се растворени во водата и се абсорбираат преку коренот. Не секогаш овие нутриенти се застапени во доволни количини во почвата, поради што во земјоделството и во градинарството се користат вештачки ѓубрива со кои тие се додаат во почвата. Минералните нутриенти се поделени на макро и микронутриенти. Макронутриенти можат да бидат примарни (азот, фосфор и калиум), кои најчесто недостапуваат во почвата, бидејќи растенијата користат големи количини на овие елементи за раст и опстанок и секундарни (калциум, магнезиум и сулфур), кои се наоѓаат во доволни количини, особено сулфурот. Овој макроелемент се создава со бавно распаѓање на органските материи во почвата, што претставува една од причините зошто косената трева и паднатите листови не треба да се фрлаат. Микронутриенти (бор, бакар, железо, хлор, манган, молибден, цинк, никел, селен и натриум) се неопходни за раст на растенијата и се по-

требни во многу мали (микро) количини. Овие елементи се познати и како елементи во трагови (2, 3). Додека макронутриенти-те се присутни во растителните ткива од 0,2 % до 4,0 % (сметано на сува маса), микро-нутриенти се присутни во количества помали од 0,02 % (2). Рециклирање на органскиот материјал како што се косената трева и паднатите листови е одличен начин за обезбедување на микро-нутриенти (како и макронутриенти) неопходни за раст и развој на растенијата. Од друга страна, направени се голем број студии за воведување на алтернативен метод за искористување на пепелта од дрвесината во земјоделството и во шумарството. Оваа пепел како одличен извор на калиум, вар и други елементи (калциум, магнезиум, манган, алуминиум, фосфор, сулфур, железо, натриум, цинк) може да се користи како додаток на почвата во земјоделството или за корегирање на недостатокот или дисбалансот на нутриентите (4). Врз основа на сето досега кажано, целта на овој труд е да се добијат податоци за содржината на нутриентите во иглички и во гранки од молика пред и по дестилација на етерично масло, со цел нивна употреба како природно ѓубриво.

Растителен материјал е собран на три различни локалитети во Република Македонија (Пелистер, Шар Планина и Ниџе), во јуни 2009 година.

Подготовката на растителниот материјал е направена од 0,5 g суви и уситнети иглички, гранки со иглички и гранки без иглички кои се ставаат во тефлонски садови за минерализација, се додаваат 8 ml концентрирана азотна киселина и 2 ml H₂O₂ (30 % m/v), садовите се затвораат, се пристегнуваат и се ставаат во роторот на микробранова печка за дигестија (CEM, USA) и минерализација. На крај, садовите се ладат, внимателно се отвораат и содржината квантитативно се пренесува во 25 ml тиквички. Испитуваните 20 елементи (Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Sr, V, Zn) се анализирани со помош на атомска емисиона спектрометрија со индуктивно спрегната плазма, AES-ICP (Varian, Model 715-ES, USA). Определување на N е направено по методот на Kjeldahl на 1 g растителен материјал.

Од вкупно 20 испитувани елементи, најзастапени макронутриенти во иглички, во гранки со иглички и во гранки без иглички од молика се калиум (2084-4277 mg/kg) и калциум (1240-2007 mg/kg). Остатокот по дестилација на етерично масло содржи помали количини на калиум и поголеми количини на калциум (сметано на сува маса), што најверојатно се должи на разликите во растворливоста на елементите во топла вода за време на дестилацијата. Содржината на магнезиумот и на фосфорот се движи од 454-696 mg/kg и 497-1364 mg/kg, соодветно и е намалена во остаток по дестилација, додека содржината на азотот се движи од 7420-18340 mg/kg и генерално е иста како во почетниот растителен материјал.

Од микроелементите, определени се никел (0,38-9,22 mg/kg), бакар (2,11-29,49 mg/kg), натриум (2,74-109,71 mg/kg), манган (17,55-144,00 mg/kg), цинк (26,81-45,01 mg/kg), железо (34,92-121,45 mg/kg) и бор (37,57-101,21 mg/kg). Содржината на ни-кел, бакар и натриум во исушен остаток од дрогата по дестилација на етерично масло е помала во споредба со почетен материјал, додека железо, цинк и бор генерално се присутни во поголема количина. Во повеќето случаи, содржината на манганот се менува во зависност од локалитетот и од растителен материјал. Според литературните податоци, иако не се смета за микро-нутриент, алуминиумот е важен елемент на пепелот од дрвесината (4). Содржината на алуминиумот во сув растителен материјал од молика се движи од 47-544 mg/kg и најчесто е присутен во поголеми количини во остатокот по дестилација. Испитуваниот растителен материјал (иглички, гранки со иглички и гранки без иглички од молика) претставува извор на макро и

микронутриенти неопходни за раст и развој на растенијата, поради што материјалот што останува по дестилација на етерични масла може да биде интересен за разгледување во насока на неговото искористување како природно ѓубриво.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kuznetsova T, Mandre M. (2005) Mineral composition of lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia* Englem) on exhausted oil shale opencast mines. *Forestry studies*, 42:105-115.
2. http://en.wikipedia.org/wiki/Plant_nutrition
3. <http://www.ncagr.gov/cyber/kidswrld/plant/nutrient.htm>
4. Liodakis S, Katsigiannis G, Lymperopoulou T. (2007) Ash properties of *Pinus halepensis* needles treated with diammonium phosphate. *Thermochimica Acta*, 453:136-146.

AN ETHNOBOTANICAL STUDY IN KAHRAMANMARAŞ (TURKEY); WILD PLANTS USED AS ECONOMIC PURPOSE IN ANDIRIN, KAHRAMANMARAŞ

Serpil Demirci, Neriman Özhatay

Istanbul University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany, 34116 Beyazit/Istanbul, TURKEY

INTRODUCTION

Turkey is one of the most floristically rich countries in the world with astonishing plant diversity. Its flora consists of about 11000 vascular plant and approximately one third of its flora (34,4 %) is endemic to the country. Along with its rich flora, it also has a wide diversity of habitats. However, they threatened and have declined rapidly over the last 40 years. Rare and sensitive habitats such as coastal dunes, peatlands, wetlands, heath lands, grasslands and old growth forest are under immense threat and declining fast, including many areas that have yet to be surveyed (1). Turkish people are quite interested in wild plants, due to the high proportion of people living in rural areas, and also for economic reasons. Kahramanmaraş province is situated in the Southern Turkey at the south part of Taurus mountains. Its plant diversity is very rich because of its localization meeting point of 3 phytogeographic region. While Irano-Turan elements are found in the east, Mediterranean elements are common in the South. Some formations of Euro-Siberian geographical region can also be seen in the humid areas (2).

MATERIAL AND METHODS

Research area named (Andirin) is a township of Kahramanmaraş province. Kahramanmaraş is located in the South-East Anatolia Region of Turkey and it consists of mountains and plains. The main mountainous parts of the province are the overhangs of the Southern Taurus Mountains in east-west direction. Binboğa, Nurhak, Ahir and Engizek are the most important mountains in the North. The hilly parts of the province begin from the West and reach to the Göksun-Andirin district (1).

The field work was carried out over a period of 9 months. During this research 52 villages have been visited, about 500 plant specimens used for local people were collected and to 265 local people are interviewed. 'An Ethnobotany info questionnaire' was administered to the local people, through face-to-face interviews. The information for these plants, such as local names, used parts, their usages, methods

of preparation, administration dosage and duration treatments have been recorded by mean of "Ethnobotany info questionnaire". The plants were identified using the standart Floras, 'Flora of Turkey and Aegean Islands' (3-5), 'Flora Iranica' (6), 'Flora Europaea' (7). The collected specimens are kept in the Herbarium of the Faculty of Pharmacy, Istanbul University (ISTE). As a result of this identification, 147 taxa of which 10 endemic have been determined for several usages (8). Demographic characteristics of the respondent were determined and recorded through face-to-face interviews using the questionform. Mean age of the respondents was 50 years, in 40-60 years range. Total respondents people are 265; child: 2, female: 75, male: 188.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, 101 wild plant taxa are used as economic are documented in Andırın (Kahramanmaraş). Local people used wild economic plants of some purpose, 52 taxa as food, 13 taxa as tool, 8 taxa as spice, 6 taxa as dye, 3 taxa as tea, 3 taxa as fuel and 16 taxa as other purpose. *Arum maculatum* L. was the plant most used by the local people. The local names of this plant are "Tirşik, Andırın doktoru, Pancar" and used as food. *Cerasus mahaleb* (L.) Miller var. *alpina* Browicz, *Crataegus aronia* (L.) Bosc. ex Dc. var. *aronia*, *Myrtus communis* L. subsp. *communis*, *Pistacia terebinthus* L. subsp. *palaestina* (Boiss.) Engler, *Punica granatum* L. were other commonly used plants as food. Fruits of *Laser trilobum* (L.) Borkh. and *Rhus coriaria* L., leaves of *Marubium vulgare* L., *Ocimum basilicum* L., *Origanum syriacum* L. var. *bevanii* (Holmes) Letswaart, *Rosmarinus officinalis* L., aerial parts of *Satureja hortensis* L. and *Thymus sipyleus* Boiss. subsp. *rosulans* (Borbas) J.Jalas were used as spice. Leaves of *Crataegus aronia* var. *aronia* and *Myrtus communis* subsp. *communis* used as herbal tea. Flowers of *Fraxinus ornus* L. subsp. *cilicica* (Lingelsh.) Yalt., fruit peel of *Punica granatum* and *Juglans regia* L., roots of *Quercus cerris* L. var. *cerris* and *Quercus coccifera* L. used as dye. *Juniperus drupacea* Ant. & Kotschy., *Artemisia absinthium* L., *Buxus sempervirens* L., *Clematis vitalba* L., *Cornus mas* L., *Eremurus spectabilis* Bieb., *Fontanesia philliraeoides* Labill. subsp. *philliraeoides*, *Fraxinus ornus* L. subsp. *cilicica* (Lingelsh.) Yalt., *Morus nigra* L., *Pinus brutia* Ten., *Quercus cerris* L. var. *cerris*, *Quercus coccifera* L., *Sorghum halepense* (L.) Pers. var. *halepense*, *Spartium junceum* L., *Styrax officinalis* L. were used as tool.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was financially supported by Istanbul University Research Fund (Project No: 6184). Many thanks are due to local people for providing us valuable information and accompanying us during the interview process; to Mr. Hüseyin Çanak director of forest management of Kahramanmaraş, for his support. Evrim Tabur who is a staff of project titled "The protection of rare plants Kahramanmaraş Ardahan project" supported by financially by BTC; to Tolga Ok for determining and confirming woody species. We would thank to the following people for their help in the field work, Alican Ala, Başar Kayıran, Kemal Küpeli, Murat Sarıbiyık, Mustafa Temiz . Finally thanks to Emine Akalın and Yeter Yeşil for their help to identify some plants

REFERENCES

- Özhatay N., Türkiye'nin BTC Boru Hattı Boyunca Önemli Bitki Alanları (Important Plant Areas along the BTC Pipeline in Turkey), BTC Şirketi, İstanbul, 2006.
Sheldon J.W., Balick M.J., Laird S.A., Medicinal Plants: Can Utilization and Conservation Coexist? Advances in Economic Botany, vol.12. The New York Botanical Garden, New York. 1997.
Davis P.H. et al., Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 1-9, Edinburgh: University Press; 1965-1985.
Davis PH, Mill RR, Tan K., Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 10 (Supplement I), Edinburgh: University Press; 1988.
Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer KHC., Flora of Turkey and the East Aegean

- Islands. Vol 11 (Supplement II). Edinburg: University Press; 2000.
Rechinger HK., Flora des Iranischen Hochlandes und der Umrahmenden Gebirge, Vol 1-175, Akademische Verlagsgesellschaft, Salzburg, 1963-2001.
Tutin TG, Heywood VH, Burges VA, Valentine DH, Walters SM, Webb DA., Flora Europea, Vol 1-4, Cambridge at the University Press, 1964-1976.
Demirci S., Andırın (Kahramanmaraş) İlçesinde Etnobotanik Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, İstanbul, 2010.

THE USE OF WILD EDIBLE PLANTS IN THE SOUTH PART OF İZMIT (NORTHWEST TURKEY)

Çağla Kızıllarslan¹, Neriman Özhatay²

¹ Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Bezmialem Vakıf University, 34093, Fatih/Istanbul, Turkey.

² Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Istanbul University, 34452, Beyazıt/Istanbul, Turkey.

INTRODUCTION

Turkey is one of the richest countries in the world in terms of plant diversity. The Turkish flora is estimated to contain more than 10.000 species of vascular plants of which about 3.034 (approximately 34 %) are endemic.

For a long time plants have played very important role in human life. Wild edible plants have great importance to the Anatolian people. Every usage of plants come out by the ethnobotanical researchs (1). Our research area, İzmit, is situated in the east part of Marmara region (Northwest Turkey). İzmit has an area of 974 km² and its population is 373.034. İzmit is a coast county which is established between the most important Asia and Europe transition line. The economy in the county mostly based on industry. Because of this, the majority of the population consists of people all around the Turkey and also immigrants from Balkans and Caucasus.

MATERIALS AND METHODS

The field works of the study were carried out between April 2006-September 2007. During this research 9 municipalities and 15 villages in İzmit were visited and plant specimens were collected with informants. The information was collected from both the elder and the young local people through interviews. Taxonomical determination of the collected specimens was made by using "Flora of Turkey and the East Aegean Islands (2, 3, 4)" and "Flora of Europaea" (5). The herbarium specimens have been kept in the Herbarium of Istanbul University, Faculty of Pharmacy (ISTE).

RESULTS AND DISCUSSION

During this research, 145 specimens were collected from the area (6). According to the results of the identifications, among these 145 plant taxa, 51 wild plant taxa are being used as food in İzmit.

The plant species were distributed among 23 families and 46 genera. The most used families are Asteraceae with 8 taxa (15,7 %), Lamiaceae and Rosaceae each with 5 taxa (9,8 %), Geraniaceae, Apiaceae and Liliaceae each with 3 taxa (5,9 %), Polygonaceae, Ericaceae and Malvaceae each with 2 taxa (3,9 %). The genera which was represented with the highest number of taxa in this study are: *Geranium*, *Malva*, *Mentha*, *Rubus* and *Rumex* by 2 species.

The most used parts of plants are respectively leaf, young stem and

fruit. Leaves are usually boiled and eaten as salad or cooked as a meal and cooked for pastry. Leaves of *Arum italicum* Miller are boiled a few times firstly and then the boiled water is thrown away because of its alkaloid content.

Leaves of *Malva nicaeensis* Wallr., *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *typhoides* (Briq.) Harley var. *typhoides*, *Mentha spicata* L. subsp. *spicata*, *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Letswaart, *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *subisophyllus* (Borbás) Jalas are used as spice.

Fruits of *Arbutus unedo* L., *Laurocerasus officinalis* Roemer, *Prunus spinosa* L. subsp. *dasyphylla* (Schur) Domin, *Rosa canina* L., *Rubus canescens* DC. var. *canescens*, *Rubus sanctus* Schreber, *Ruscus hypoglossum* L., *Solanum nigrum* L. subsp. *nigrum* are eaten fresh or eaten as jam.

Stem of *Chaerophyllum byzantinum* Boiss. and *Raphanus raphanistrum* L., stem and stalk of *Heracleum platytaenium* Boiss. and leaf of *Oenanthe pimpinelloides* L. are eaten as pickles.

Among 51 wild edible plants, only bulb of *Ornithogalum sigmoideum* Freyn&Sint. is used as food by cooking with rice. Flower of *Rhodendron ponticum* L. subsp. *Ponticum* is used for getting "Deli Bal (Poisonous honey)". This contains Grayanotoxin I (Andromedotoxin) and can cause poisoning (7). Only petals of *Papaver rhoeas* L. are drunk as sherbet after boiling. Aerial parts of *Urtica dioica* L. and *Lamium purpureum* L. var. *purpureum* are cooked with vegetables or rice as meal and cooked for pastry.

Some plants have the same local name, in spite of belonging to different species, such as "kekik" (*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Letswaart and *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *subisophyllus* (Borbás) Jalas).

The results of our study show that even in countries that are situated in close proximity to metropolitan cities, the edible plants usages and its applications are still alive. The knowledge handed down through generations about wild edible plants, which are important as a food source, should be studied in detail for all parts of the world.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was financially supported by Istanbul University Research Fund (Project No: T-989/06102006). Thanks due to all interviewers who participated in this study by providing information.

REFERENCES

1. Baytop, T., Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1999.
2. Davis PH et al., Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 1-9, Edinburgh: University Press; 1965-1985.
3. Davis PH, Mill RR, Tan K., Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Vol. 10 (Supplement I), Edinburgh: University Press; 1988.
4. Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer KHC., Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Vol 11 (Supplement II). Edinburgh: University Press; 2000.
5. Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA., Flora of Europaea. Vol 1-5, Cambridge University Press; 1964-1980.
6. Kızılarlan, Ç., İzmit Körfezi'nin Güney Kesiminde Etnobotanik Bir Araştırma, M.Sc. thesis, İstanbul University, İstanbul, 2008.
7. Sütülpınar N, Mat A, Satganoglu Y. Poisoning by Toxic Honey in Turkey. Arch Toxicol 67: 148-150, 1993.



**ФАРМАЦЕВТСКА
ТЕХНОЛОГИЈА
И БИОФАРМАЦИЈА**
орални презентации

**PHARMACEUTICAL
TECHNOLOGY
AND BIOPHARMACY**
oral presentations

MEDICAL DEVICE / DRUG COMBINATION PRODUCTS: A PERFECT MIX FOR BIOTHERAPEUTICS

Sema Çaliş

Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara-TURKEY

Medical Device is a product which is used for medical purposes in patients in diagnosis therapy and surgery. When applied to the body the effect of a medical device is primarily physical in contrast to pharmaceutical drugs, exerting a biochemical effect. Medical devices care for human injuries, meet human anatomical needs and maintain human physiological functions so they are required for supporting or sustaining human life.

Medicinal product is defined as "any substance or combination of substances which may be used in or administered to human beings with a view to restoring, correcting or modifying physiological functions by exerting a pharmacologic, immunological or metabolic action or to making a medical diagnosis"

Currently, in the pharmaceutical industry, medical device combination products are experiencing a significant growth as about 30% of the products which are under development are reported to be combination products. Drug-eluting stents are projected to account for approximately 70% of the combination products market in 2009. Also, market projection for drug-device combination products showing that, with an increase from 5.4 b dollars in 2004 to 11.5 b dollars in 2010, 13% annual growth and USA dominating the market.

Most important needs to be stated for this area are requirements for long-term patient care and interest in localized drug delivery with improved therapeutic effectiveness...

Combination products are defined in CFR(e) as; "A product comprised of two or more regulated components i.e. drug/device, biologic/device, drug/biologic or drug/device/biologic that are physically, chemically or otherwise combined or mixed and produced as single entity..." Here, it is important to note that a drug-drug, biologic-biologic or device-device combinations most concomitant use of drugs, devices and biologics do not constitute a *combination product*.

Monoclonal antibody combined with a therapeutic drug, device coated or impregnated with a drug or biologic as a drug-eluting stent, pacing lead with steroid coated tip, catheter with antimicrobial coating, orthopedic implant with growth factors, transdermal patches, metered-dose inhalers, insulin injector pens are some typical examples of combination products where the components are physically, chemically or otherwise combined. (CFR 3.2e).

According to the MEDDEV recommendation, the following criteria should be considered to categorize the product as a medical device or a medicinal product: (i) Intended purpose, including an assessment of the way the product is presented, (ii) method by which primary mode of action is achieved, following the manufacturer's claims, labeling and scientific data. A product never can be a medicinal product and have CE marking. For a medicinal product, authorization by a competent authority: proof of quality, safety and efficacy are the requirements.

As a conclusion: Combination products offer therapeutic benefits and pose challenges for both regulators and industry, regulatory differences derive from underlying product differences. Number and types of combination products will continue to grow in future.

FROM HOLLOW POLYMERIC NANOPARTICLES TO ENTRAPPED DNA

Ivaylo Dimitrov¹, Elisaveta Petrova¹,
Rahila Kozarova², Margarita Apostolova²,
Christo B. Tsvetanov¹

¹Institute of Polymers, Bulgarian Academy of Sciences, 1113 Sofia, Bulgaria

²Institute of Molecular Biology, Bulgarian Academy of Sciences, 1113 Sofia, Bulgaria

It is well known that the administration of naked pDNA leads to rapid enzymatic degradation upon intramuscular, intra-dermal or intravenous injection [1]. Therefore, gene transfer to humans requires carriers for the plasmid DNA which can efficiently and safely deliver the gene into the nucleus of the desired cells. Condensation and encapsulation of DNA into micro and nano-particles is widely used for the delivery of nucleic acid for both *in vitro* and *in vivo* applications [2]. The majority of particle formulations are based on electrostatic interaction between anionic phosphate groups in DNA and a cationic carrier, usually composed of building blocks with positively charged nitrogen atoms. However, the major disadvantage of cationic particles is their interaction with serum proteins, extracellular matrix components or blood cells *in vivo*. This can lead to aggregation or immobilization of these systems [3].

Recently, polish and bulgarian scientists [4-6] developed a novel synthetic strategy for the preparation of hollow nano- and micro-particles that involves three steps: temperature-induced phase transition of temperature-responsive polymer (TRP), shell formation by seeded radical copolymerisation, and a subsequent dissolution of TRP by dialysis at lower temperatures. This approach opens a new pathway for the preparation of mechanically stable polymeric capsules at a wide range of sizes. The method has certain advantages in that it allows the TRP template to be partially removed from the matrix under very mild conditions.

Based on this finding we have developed a novel method for encapsulation of nucleic acids into degradable polymer capsules with potential applications as gene delivery systems. Herein we present a general, one-pot, non-destructive method for polyplex stabilization under mild conditions (Figure 1).

Figure 1. Schematic illustration of DNA encapsulation via polyplex for-

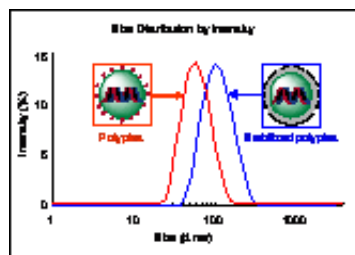


mation followed by stabilization through seeded radical copolymerization.

Initially, a hybrid block copolymer comprising thermally sensitive block of poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) and polycationic block of poly(L-lysine) was synthesized. The desired number of lysine units in the block copolymer was achieved applying controlled ammonium-mediated ring-opening polymerization of *Z*-L-lysine *N*-carboxyanhydride⁽⁷⁾. Polyplexes were formed at room temperature by a dropwise addition of DNA solution (100µg/ml, salmon sperm DNA, 2000 bp) to

aqueous block copolymer solutions of different concentrations. Stable polyplexes with maximum DNA condensation were obtained at cationic to phosphate groups molar ratio N/P = 5:1. The particle diameter was determined to be around 60 nm (Figure 2).

Figure 2. Size distribution of polyplex N/P=5:1 (d=56.4 nm; Pdl: 0.157;



$\zeta=43.6$ mV) and the corresponding stabilized polyplex (d=102.4 nm; Pdl: 0.172; $\zeta=13.1$ mV)

For enhancing the intracellular delivery of the DNA-containing nanoparticles to specific cells, one of the most widely applied approaches is the attachment of cell recognizable targeting ligands. The use of targeting ligands allows the uptake of DNA into cells via receptor-mediated endocytosis. The folate receptor on the cell membrane is a potential molecular target for tumor-selective drug delivery. This receptor is highly expressed in a number of epithelial carcinomas, while it occurs in a limited number of normal cells⁽⁸⁾. Folate targeting moieties were introduced onto the surface of the stabilized polyplexes through a seeded radical copolymerization of NIPAM and heterobifunctional PEG-macromonomer bearing terminal acryloyl and folate groups.

To demonstrate the versatility of the proposed method and the potential biomedical applications the polyplexes were stabilized with biodegradable outer polymer shell. The seeded radical copolymerization was performed in the presence of the disulfide containing cross-linking reagent N,N'-bis(acryloyl)cystamine (BAC). Disulfide bonds degrade under reducing conditions or via thiol-disulfide exchange occurring in the cells and can be applied for intracellular triggered gene delivery⁽⁹⁾. The exchange of the common cross-linker BIS with the biodegradable BAC does not affect the sizes of the stabilized polyplexes, which is indicative for the versatility of DNA encapsulation approach.

Finally, the biocompatibility of the hybrid copolymer and the polyplexes, both before and after the stabilization step were evaluated. This is an important characteristic for potential biomedical applications. The cytotoxicity was evaluated with HeLa cell culture. It was found that there is no apparent cytotoxic effect of block copolymer, unmodified and stabilized polyplexes (cell viability more than 80%). The results indicate that the stabilized polyplexes can be further evaluated for potential biomedical applications.

In conclusion, the outlined versatile approach for DNA encapsulation provides opportunities to prepare nano-scaled delivery vehicles with various functions depending on the particular targeted problem. We demonstrated that the complexes between DNA and a hybrid block copolymer can be additionally stabilized through the formation of cross-linked polymer outer shell applying seeded radical polymerization. All synthetic steps are done in aqueous media under mild conditions. Moreover, the DNA containing nanoparticles can be relatively easy decorated with targeting moieties. The use of disulfide cross-linker during the seeded radical polymerization imparts biodegradability of the stabilizing polymer shell. We believe that the proposed

approach for DNA encapsulation opens the possibility to tune the properties of the delivery vehicle in order to find an optimal balance between protection and release of DNA.

Acknowledgement: This work was supported by the National Science Fund (Bulgaria) "Ideas" DO 02-247/18.12.2008.

REFERENCES

- Houk B.E., Martin R., Hochhaus G., Hughes J.A., Pharm. Res., **18**, (1), 67-74 (2001).
De Smedt S.C., Demeester J., Hennink W.E., Pharm. Res., **17**, (2), 113-126 (2000).
Rupponen M., Ronkko S., Honkakoski P., Pelkonen J., Tammi M., Urtti A., J. Biol. Chem., **276**, 33875-33880 (2001).
Weda P., Trzebicka B., Dworak A., Tsvetanov Ch.B., Polymer, **49**, 1467-1474 (2008)
Dimitrov Ph., Toncheva N., Weda P., Rangelov S., Trzebicka B., Dworak A., Tsvetanov Ch.B., Macromol. Symposia, **278**, 89-95 (2009) Special Issue: Molecular Order and Mobility in Polymer Systems
Trzebicka B., Weda P., Utrata-Wesolek A., Dworak A., Tsvetanov Ch.B., J.Polymer Sci., Part A: Polymer Chemistry, **48**, (18) 4074-4083 (2010).
Dimitrov, I.; Schlaad, H. Chem. Commun. **2003**, 2944-2945.
Lu, Y.; Low, P. Adv. Drug Del. Rev. 2002, 54, 675-693.
Saito, G.; Swanson, J.; Lee, K. Drug Deliv. Rev. 2003, 55, 199-215.

HOW WELL DO WE UNDERSTAND THE BEHAVIOUR OF POLYMER MATRIX TABLETS?

Saša Baumagrtner

University of Ljubljana, Faculty of Pharmacy, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana, Slovenia

INTRODUCTION

Modified-release matrix tablets have been extensively used by the pharmaceutical industry as one of the most successful oral drug-delivery systems. However, the development of innovative formulations is still very challenging, because the mechanisms regulating drug release are complex and depend on many factors.

Critical parameters involved in the release from polymer matrix tablets are related to drug molecule characteristics (molecular weight, solubility, particle size, dose), characteristics of the selected polymer (type, molecular weight, particle size, viscosity, composition of dissolution media, etc.) and formulation parameters (tablet characteristics, manufacturing process, etc). Some of these parameters are well studied; meanwhile the others are still the subject of intense research (1, 2). It should be pointed out that detailed knowledge of critical parameters is necessary to achieve the final goal: to formulate tablets with desired biopharmaceutical and pharmacokinetic properties.

Today, there is a growing interest in the research of polymer characteristics on the molecular basis, because sometimes this is the only way to explain differences in drug release. For this type of investigations sophisticated analytical methods are necessary: atomic force microscopy (AFM), magnetic resonance imaging (MRI), confocal laser scanning microscopy (CLSM), application of enzymatic assays etc. (3, 4, 5).

On the other hand intensive research is going on regarding the physiological conditions within GI tract; transit times through the different regions, and detailed investigation of the disease condition. There is

a great potential to exploit these conditions as a trigger for drug release (6, 7, 8).

It is difficult to present the whole picture of polymer matrix tablet behaviour. Therefore, the aim of this contribution is to emphasize the results obtained in basic research of polymers on the molecular level are reflected on macroscopic scale.

REFLECTION OF XANTHAN POLYMER STRUCTURE ON THE DRUG RELEASE

It is known that non-ionic polymer like HPMC represents a golden standard for formulation of matrix tablets with prolonged drug release (1, 4). However, as an alternative natural polymer like xanthan (XAN) is suggested. XAN is an anionic poly-electrolyte that forms different complex secondary structures depending on environmental conditions. AFM investigations confirmed that increased ionic strength changed the XAN secondary structure (9). These changes were reflected on macroscopic level, because at increased ionic strength or pH 1.2 swelling of XAN tablets was lower and drug release faster. Swelling was investigated using MRI, where new method for precise determination of moving front positions within swollen tablet was developed (Fig.1). Moreover, experiments simulating physiological conditions showed that variations of media influenced XAN gel structure relatively quickly, and consequently affected the drug release kinetics (10).

It was concluded that low pH or high ionic strength cause formation of more rigid and dense polymer structure, where interactions with water are lower, therefore swelling of matrix tablets is lower, the formed gel is more rigid and thinner leading into faster drug release.

DM and CARRs have a strong impact on drug release mechanism. It was proven that DM and CARR form complexes *in situ*. These interactions were confirmed by DSC, SEM and zeta potential measurements. Only dual drug release control provided through the combination of water-uptake/erosion with *in situ* complexation, prolonged DM release for more than 24 hours. The rate order of release was in accordance with the number of sulfate moieties per disaccharide unit of CARR polymers (11).

To investigate the type of interactions responsible for DM-CARR complex formation, special DM ion-selective membrane electrode was made and applied for construction of binding isotherms. Strong electrostatic interactions between DM and negatively charged CARRs were confirmed, however, cooperativity effects through the hydrophobic interactions between bound DM have a major impact on the formation of DM-CARR complexes and on drug release rate (12).

CONCLUSION

The structure of polymers and their interactions with drug molecules is far from being completely understood. Therefore, prediction of polymer matrix tablet behaviour in GI tract represents a big challenge for future research.

REFERENCES

- Colombo P, Santi P, Bettini R, et al. Drug release from swelling-controlled systems, in: D.L. Wise (Ed.), Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology, Marcel Dekker, Inc, New York, 2000.
- Maderuelo C, Zaruelo A, Lanao JM. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. J. Control. Release 2011; doi:10.1016/j.jconrel.2011.04.002.
- Mikac U, Kristl J, Baumgartner S. Using quantitative magnetic resonance methods to understand better the gel-layer formation on polymer-matrix tablets. Expert opinion on drug delivery. 2011; 8: 677-692. S.
- Viridén A, Larsson A, Schegerlöf H, Wittgren B. Model drug release from matrix tablets composed of HPMC with different substituent heterogeneity. Int. J. Pharm. 2010; 401: 60-67.
- Govedarica B, Baumgartner S, Teskač K, Dolenc A, et al. Atomic force microscopy - a new way of analysis and characterization of pharmaceutical materials. Tehnika (Beogr.), 2010; 65: 3-8.
- Wilson CG. The transit of dosage forms through the colon. Int J Pharm. 2010; 395: 17-25.
- Mandal AS, Biswas N, Karim KM, Guha A, Chatterjee S, et al. Drug delivery system based on chronobiology – A review. J. Control Release 2010; 147: 314-325.
- Varum FJO, Merchant HA, Basit AW. Oral modified-release formulation in motion: The relationship between gastrointestinal transit and drug absorption. Int. J. Pharm. 2010; 395: 26 – 36.
- Govedarica B, Sovány T, Pintye-Hódi K, Škarabot M. et al. Prediction of Swelling and Dissolution Rate in Xanthan Matrix Tablets Using Atomic Force Microscopy. Pharm Res, 2011, Submitted manuscript.
- Mikac U, Sepe A, Kristl J, Baumgartner S. A new approach combining different MRI methods to provide detailed view on swelling dynamics of xanthan tablets influencing drug release at different pH and ionic strength. J. Control Release 2010; 145: 247-256.
- Pavli M, Vrečer F, Baumgartner S. Matrix tablets based on carrageenans with dual controlled release of doxazosin mesylate. Int. J Pharm.. 2010; 400: 15-23.
- Pavli M, Baumgartner S, Kos P, Kogej K. Doxazosin-carrageenan interactions: A novel approach for studying drug-polymer interactions and relation to controlled drug release. Eur. J. Pharm Sci. 2011, Submitted manuscript.

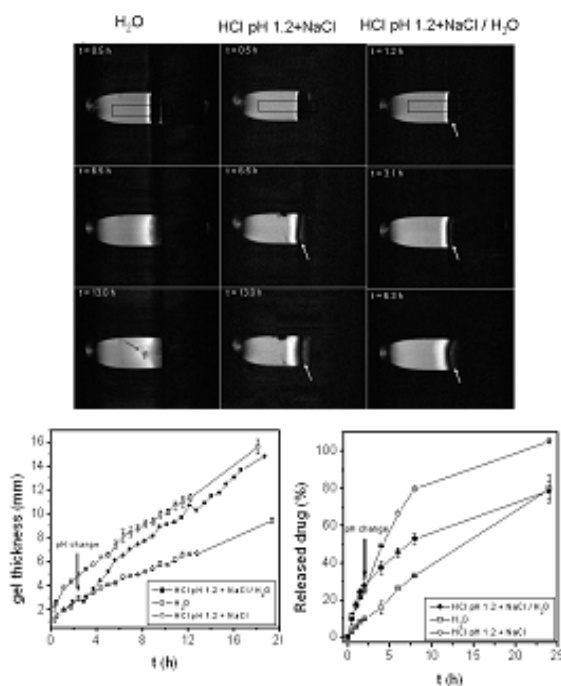


Fig. 1: Gel layer thickness of xanthan tablets determined by MRI and drug release from these tablets (10).

CARRAGEENANS – DUAL DRUG RELEASE CONTROL

Carrageenans (CARRs) are another alternative to non-ionic polymers. They are anionic poly-electrolytes with various number of sulfate moieties per disaccharide unit, resulting in formation of different secondary structures. When cationic drug such as doxazosin mesylate (DM) is incorporated into CARRs matrix tablets, interactions between

CURRENT PERSPECTIVES ON DISINTEGRATION EVALUATION OF ODT

Jachowicz R.¹, Brniak W.¹, Krupa A.¹, Skórka T.²,
Niwiński K.¹

¹Chair and Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics Jagiellonian University Medical College, Cracow, Poland

²Department of Magnetic Resonance Imaging, Institute of Nuclear Physics Polish Academy of Sciences, Cracow, Poland.

Nowadays, increasing numbers of active principle ingredients (API) are formulated into orodispersible tablets (ODTs), which are suitable for many patients with swallowing difficulties of solid dosage forms. A small amount of saliva is sufficient for dispersing tablets in the oral cavity. After swallowing particles in normal way, released drug is absorbed from gastro-intestinal tract resulting in desired therapeutic action. According to the European Pharmacopoeia 6th edition, the disintegration time of tablets in mouth should not be longer than 3 minutes, according to FDA guidance for ODTs (2008) approximately 30 s. Therefore the main properties of ODTs are rapid absorption of water resulting in disintegration into individual particles. Until today neither Eur. Ph. nor USP specified disintegration test for ODTs provide the correlation with disintegration time in the oral cavity.

There are many different approaches to develop disintegration method, which is more determinant and biorelevant. The proposed tests employ a modified dissolution apparatus, novel type of apparatus with CCD-camera, texture analyser instrument, or sieve method. Last year a new disintegration testing apparatus (ODT 101) was proposed by Harada et al. for further improvement disintegration evaluation.

Several methods have been developed to prepare ODTs and different excipients have been tested. Tablets can be manufactured by lyophilisation moulding or compression. Direct compression is the most preferable method because of its simplicity and cost – effectiveness but the properties of active substance and excipients influence tablet's characteristics. Among different excipients co-processed systems for direct compression process are also commercially available e.g. Pharmaburst, F-Melt, Ludiflash, Pearlitol. During co-processing two or more known excipients are combined together in a technological process and form material with new properties. They are characterised by a fixed and homogenous distribution of ingredients that prevents their segregation during compaction process. Moreover their application of spray-drying process results in the formulation of highly porous granules, which assure rapid disintegration of tablets in the saliva.

For evaluation disintegration properties in this study two co-processed excipients for direct compression of orodispersible tablets: F-Melt type C, and Pharmaburst were used. Placebo tablets containing one of the excipients and sodium stearyl fumarate as a lubricant were prepared with compression force of 10-20 kN. Tablet properties and their mechanical parameters (hardness and friability) were evaluated.

The disintegration time was measured by using standard pharmacopoeial disintegration apparatus and modified version of rotating shaft apparatus constructed in the Department (based on proposition of Narazaki et al.). To determine disintegration time, 2-15 ml of distilled water or simulated salivary fluid were used. Computer software allowed a plotting of disintegration profiles.

In order to obtain additional data on disintegration process of prepared formulations magnetic resonance imaging (MRI) technique and wetting test with visual observation were applied. The results were

compared with disintegration time in the oral cavity.

Moreover, the influence of ibuprofen as a practically insoluble drug on disintegration time of tablets was evaluated.

The varied hardness of placebo tablets was directly related to compression force. The friability of Pharmaburst tablets was approximately two times higher than F-Melt tablets compressed with the same compression force.

In comparison to the pharmacopoeial disintegration apparatus the influence of compression force on disintegration time was intensively marked in the case of modified rotary shaft apparatus.

There was a good correlation between the values obtained by using modified rotary shaft apparatus and those obtained in oral cavity. Moreover, the modified rotary shaft method showed better discriminatory power in analysis of ODT's disintegration characteristics than pharmacopoeial test. Taking into account the values of correlation coefficient R^2 the better *in vitro/in vivo* correlation was achieved for modified rotary shaft apparatus ($R^2 = 0,7058$) than for pharmacopoeial disintegration test ($R^2 = 0,5223$).

The incorporation of ibuprofen into the tablet mass changed tablets properties. The analysis revealed that using F-Melt resulted in drastic elongation of disintegration time. Such formulations disintegrated in 4-12 minutes, when placebo tablets only 24 – 46 seconds. Pharmaburst tablets with ibuprofen disintegrated in similar time (33-116 s) as placebo (36-95 s).

The computer software connected with rotary shaft apparatus registered tablet's thickness changes during disintegration, due to swelling or erosion.

Application of magnetic resonance imaging method allowed the better understanding of disintegration process. Solvent penetration inside the tablet, wetting of tablet mass, swelling, and erosion were observed.

The application of both co-processed excipients were useful in development of orally disintegrating tablets. However, only Pharmaburst formulations characterized with appropriate disintegration properties independently on drug amount.

The work was supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education, grant no. N N405 024439.

REFERENCES

- Gohel M.C.: *A review of co-processed directly compressible excipients*, J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 8, 1, 2005, 76-90.
- Okuda Y., Irisawa Y., Okimoto K., Osawa T., Yamashita S.: *A new formulation for orally disintegrating tablets using a suspension spray-coating method*, Int. J. Pharm. 382, 2009, 80-87.
- Harada T., Narazaki R., Ohwaki T., Uchida T.: *Effect of physical properties of orally disintegrating tablets on disintegration time as determined by a new apparatus*, J. Drug Del. Sci. Tech. 20(5), 2010, p. 377-383.

IDENTIFICATION OF DIFFERENT SOLID-STATE MODIFICATIONS OF ATORVASTATIN CALCIUM IN FILM-COATED TABLETS BY DERIVATIVE FT-IR SPECTROSCOPY

Gjorgji Petruševski, Suzan Memed-Sejfulah, Sanja Simeonovska, Marina Kajdzanoska, Irena Brašnarska, Nataša Karalija, Ema Kikovska-Stojanovska, Biljana Šapkareva, Sonja Ugarkovic

Research and Development, ALKALOID AD, Aleksandar Makedonski 12, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

1. INTRODUCTION

Atorvastatin is HMG-CoA reductase inhibitor, mostly marketed as calcium salt. It is a new generation synthetic lipid lowering agent [1]. Numerous polymorphic forms of atorvastatin calcium have been reported in the literature [2], including amorphous, anhydrous and crystalhydrate modifications. The control of the polymorphic form in the finished formulation is of great importance as the different polymorphs usually exhibit different physical and chemical properties. Generally, if induced polymorphic change can occur during the production process, it will most probably alter the dissolution profile and eventually affect the bioavailability of the drug product. On the other hand, different solid forms of one active pharmaceutical ingredient (API) can have different impurity profiles [3]. Therefore, here we present the application of second-derivative Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in direct identification of amorphous, anhydrous and one crystalhydrate modification of atorvastatin calcium in film-coated tablets.

2. METHODS AND MATERIALS

Infrared spectra were obtained on Varian-660 FT-IR spectrometer. As model drug compounds amorphous, anhydrous (Form VIII) and trihydrate (Form I) atorvastatin calcium compounds were used. As model drug product, atorvastatin 80 mg film-coated tablets, based on the mentioned polymorphic forms were produced as small laboratory batches.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Studying the polymorphic form of the API in low dosage film-coated tablets, where the content of the drug compound is less than 10% is generally considered as very complicated and demanding research task. Different solid-state techniques are applied for these purposes, from which most common are the powder X-ray diffraction and the vibrational spectroscopy (infrared and Raman) [1]. The FT-IR spectroscopy involves the simplest instrumentation and it is the most widely spread analytical technique for identification purposes in the pharmaceutical industry. The main obstacle for application of this technique in identification of the polymorphic form in low dosage film-coated tablets is the low intensity of the bands from the incorporated API as a consequence of very low concentration.

In the case of atorvastatin calcium, FT-IR spectroscopy can be easily applied for identification of the different polymorphic forms of the pure API (Fig. 1). As it can be seen, characteristic spectral differences among the studied polymorphic forms can be identified in the:

combined OH and NH stretching region (above 3100 cm^{-1}), the carbonyl stretching ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$), ring related vibrations (1600-1500 cm^{-1}) and etc.

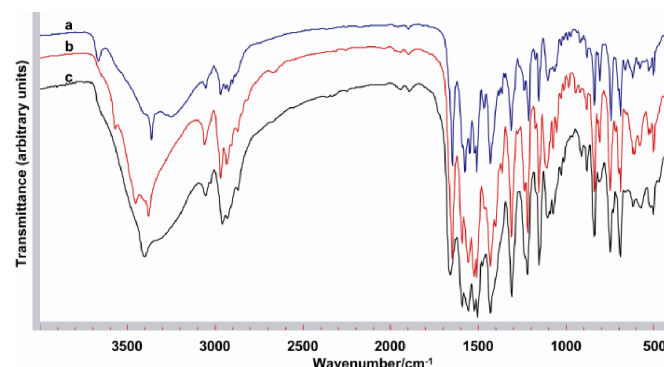


Figure 1. FT-IR spectra of atorvastatin calcium: (a) trihydrate-form I, (b) anhydrous - form VIII and (c) amorphous.

On the other hand, situation is much more complicated when FT-IR spectra of film-coated tablets (same placebo with different polymorphic form) are being compared (Fig. 2).

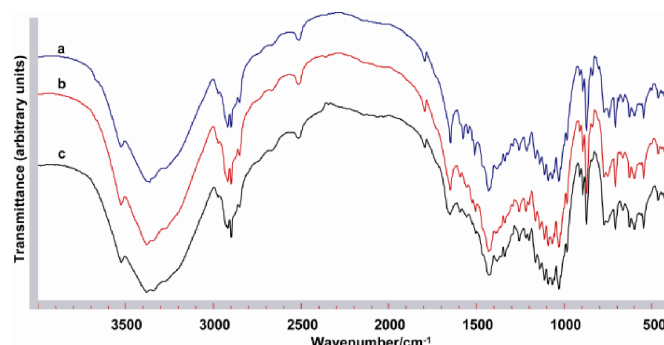


Figure 2. FT-IR spectra of atorvastatin 80 mg film-coated tablets produced with different polymorphic form: (a) trihydrate-form I, (b) anhydrous - form VIII and (c) amorphous.

It can be seen that most of the bands originating from the API are totally obscured, except the carbonyl stretching and ring related vibrations (1660-1500 cm^{-1}). Although, they are visible in the spectrum of the formulation, the corresponding intensity is very low, making them unreliable for polymorph identification purposes. In order to amplify the signal, second derivative in the studied spectral region was calculated for each FT-IR spectrum of the pure polymorphic forms and the corresponding film-coated tablets. It can be noticed (Fig. 3) that the derivation of the signal affords better resolution between the studied bands in the FT-IR spectra of the film-coated tablets, making the comparison with spectra of the pure compounds more precise and reliable.

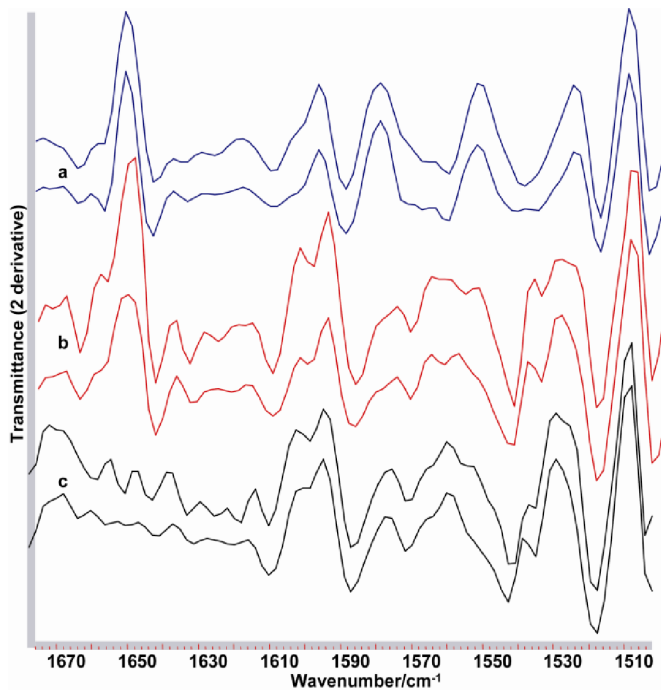


Figure 3. Derivative FT-IR spectra of atorvastatin 80 mg film-coated tablets, compared to the derivative FT-IR spectra of the corresponding polymorphic form: (a) trihydrate-form I, (b) anhydrous – form VIII and (c) amorphous.

4. CONCLUSION

The obtained data revealed that second-derivative FT-IR spectroscopy can be successfully applied in identification of amorphous, anhydrous (Form VIII) and trihydrate (Form I) polymorphic forms of atorvastatin calcium in film-coated tablets.

REFERENCES

- [1] D. Skorda, C. G. Kontoyannis, *Talanta*, **74** (2008) 1066–1070.
- [2] V. M. Sonje, L. Kumar, C. L. Meena, G. Kohli, V. Puri, R. Jain, A. Bansal, H. G. Brittain, *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology*, Volume 35, 2010, Elsevier Inc.
- [3] G. Petruševski, S. Ugarkovic, P. Makreski, *J. Mol. Struct.* **993** (2011), 328–335.

ИДЕНТИФИКАЦИЈА НА РАЗЛИЧНИ ЦВРСТИ ФОРМИ НА АТОРВАСТАТИН КАЛЦИУМ ВО ФИЛМ-ОБЛОЖЕНИ ТАБЛЕТИ СО ПРИМЕНА НА ДЕРИВАТИВНА ИНФРАЦРВЕНА СПЕКТРОСКОПИЈА

Ѓорѓи Петрушевски, Сузан Мемед-Сејфулах, Сања Симеоновска, Марина Кајданоска, Ирена Брашнарска, Наташа Каралија, Ема Киковска-Стојановска, Билјана Шапкарева, Соња Угарковиќ

Истражување и развој, АЛКАЛОИД АД, Александар Македонски 12, 1000 Скопје, Република Македонија

1. ВОВЕД

Аторвастатинот е инхибитор на HMG-CoA редуктаза, најчесто достапен како калциумова сол. Тој е синтетички статин од нова генерација и се употребува за намалување и контрола триглицеридите и холестеролот во крвта. Во литературата се познати голем број различни полиморфни облици на аторвастатин калциум [2]. Контролата на полиморфната форма на фармацевтски активното соединение (ФАС) во крајниот производ е од голема важност бидејќи различните полиморфни облици најчесто покажуваат различни физички и хемиски својства. Ако за време на производствениот процес може да дојде до полиморфна трансформација, тоа најверојатно ќе се одрази врз профилот на растворливост, што пак може индиректно да влијае на биорасположивоста на лекот. Од друга страна, различните цврсти форми на едно ФАС може да имаат различен профил на сродни онечистувања [3]. Во овој труд е презентирана нова метода за директна идентификација на три цврсти модификации на аторвастатин калциум во филм-обложени таблети со примена на деривативна (втор извод) Фурие трансформна инфрацрвена (ФТ-ИЦ) спектроскопија.

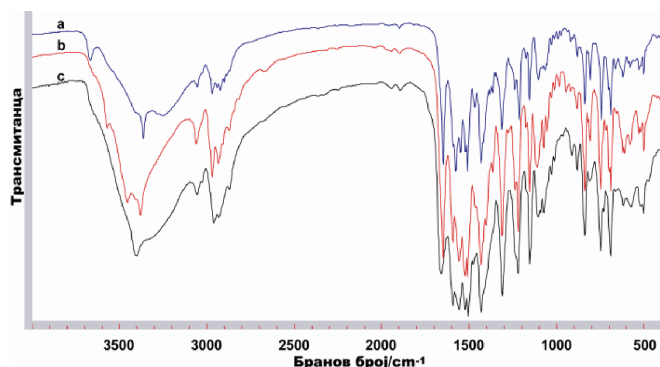
2. МЕТОДИ И МАТЕРИЈАЛИ

Инфрацрвените спектри беа снимени на Varian-660 ФТ-ИЦ спектрометар. Како модел за ФАС беа користени: аморфна, безводна (Форма VIII) и трихидратна (Форма I) модификација на аторвастатин калциум. Врз база на овие полиморфи, беа изработени лабораториски примероци на аторвастатин 80 mg филм-обложени таблети.

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

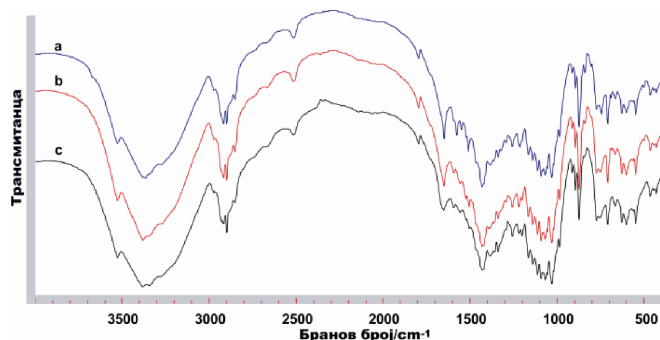
Изучувањето на полиморфната форма на ФАС кај ниско-дозираниите филм-обложени таблети, каде содржината на активната компонента е пониска од 10 %, претставува сложена истражувачка задача. За овие цели досега се применувани различни инструментални техники, во прв ред, рендгенската дифракција од спршени примероци и вибрационата (инфрацрвена и Раманска) спектроскопија [1]. ФТ-ИЦ спектроскопија вклучува наједноставна инструментација и е најраспространета аналитичка техника за идентификација во фармацевтската индустрија. Главната пречка за примена на оваа техника за идентификација на полиморфните форми во ниско-дозираниите фармацевтски препарати е слабиот интензитет на лентите од инкорпорираното ФАС, како последица на ниската концентрација. Во случајот на аторвастатин калциум, ФТ-ИЦ спектроскопија може лесно да биде применета за идентификација на различните поли-

морфни форми на чистото ФАС (Сл. 1). Како што може да се забележи, карактеристични спектрални разлики меѓу изучуваните полиморфи постојат во повеќе региони: ОН и NH валентни вибрации (над 3100 cm^{-1}), антисиметричната карбонилна вибрација ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$), подрачјето на карактеристичните вибрации кои потекнуваат од ароматските прстени ($1600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$) и др.

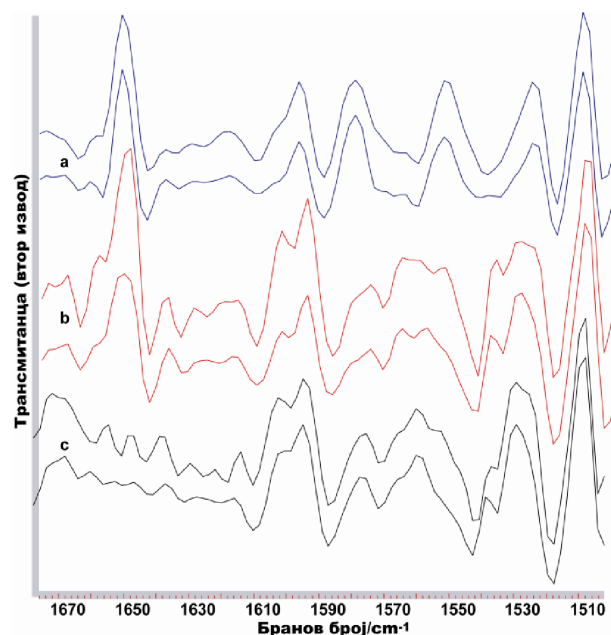


Слика 1. ФТ-ИЦ спектри на аторвастатин калциум: (а) трихидрат-форма I, (б) безводен-форма VIII и (с) аморфен

Ситуацијата е далеку покомплицирана кога се споредуваат ФТ-ИЦ спектрите на филм-обложени таблети (Сл. 2). Може да се забележи дека поголем број од лентите на активната компонента се целосно прекриени, со исклучок на лентите кои потекнуваат од карбонилната група и ароматските прстени ($1670\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$). Иако тие се видливи во спектарот на формулацијата, нивниот интензитет е многу слаб, правејќи ја идентификацијата на полиморфниот облик несигурна. За да се засили добиениот сигнал, беше пресметан втор извод за секој ФТ-ИЦ спектар на чистите полиморфни форми и соодветните филм-обложени таблети. Се забележува (Сл. 3) дека деривацијата на сигналот овозможува подобра резолуција меѓу лентите од интерес во ФТ-ИЦ спектрите на филм-обложени таблети, чинејќи ја споредбата со соодветните спектри на чистото ФАС прецизна и посигурна.



Слика 2. ФТ-ИЦ спектри на аторвастатин 80 mg филм-обложени таблети изработени со различни полиморфни форми: (а) трихидрат-форма I, (б) безводен-форма VIII и (с) аморфен.



Слика 3. Деривативни ФТ-ИЦ спектри на аторвастатин 80 mg филм-обложени таблети, споредени со ФТ-ИЦ спектри на соодветните полиморфни форми: (а) трихидрат-форма I, (б) безводен-форма VIII и (с) аморфен

4. ЗАКЛУЧОК

Добиените резултати покажуваат дека деривативната ФТ-ИЦ спектроскопија може успешно да се применува за директна идентификација на изучуваните полиморфни форми на аторвастатин калциум во филм-обложени таблети.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] D. Skorda, C. G. Kontoyannis, *Talanta*, **74** (2008) 1066–1070.
- [2] V. M. Sonje, L. Kumar, C. L. Meena, G. Kohli, V. Puri, R. Jain, A. Bansal, H. G. Brittain, *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology*, Volume 35, 2010, Elsevier Inc.
- [3] G. Petruševski, S. Ugarkovic, P. Makreski, *J. Mol. Struct.* **993** (2011), 328–335.

MOLECULAR INTERACTIONS BETWEEN SELECTED SODIUM SALTS OF BILE ACIDS AND MORPHINE HYDROCHLORIDE

Janoš Čanadi¹, Mihalj Poša², Gyula Batta³

¹Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Serbia,

²Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Serbia,

³Department of Chemistry, University of Debrecen, H-4032 Debrecen, Egyetem tér 1, Hungary

Our research interest concerns to the investigation of the interactions between certain bile acids derivatives and morphine. The objective of this study was to explain at a molecular level the prolonged analgesic action of morphine hydrochloride observed in the presence of sodium 12-oxochenodeoxycholanate. It is assumed in the literature that this

phenomenon is due to the formation of aggregates between the molecules of bile acids and morphine in the intracellular solution [1]. In addition to the salt of the mentioned bile acid, the investigation encompassed also sodium salts cholic and 7-oxodeoxycholic acids. Saturation transfer difference NMR experiments showed that the aggregates between the tested drug and bile acid are formed provided the concentration of the bile acid salt is close to the critical micellar concentration (CMC). It was found that morphine molecule binds to the bile acid micelle via its H1 and H2 aromatic protons. The values of spin-lattice relaxation times [2,3] (T_1) of these protons decrease significantly in the presence of micellar solutions of the investigated bile acid salts, the most pronounced decrease in T_1 being observed for sodium 7-oxodeoxycholate. Diffusion-ordered NMR experiment suggested that the interaction with morphine hydrochloride is possible only in the case of the micellar solution of sodium 7-oxochenodeoxycholate. In the presence of bile acids, the transfer rate constant (k_{12}) of morphine hydrochloride from the buffered aqueous solution to chloroform (model of the cell membrane) shows a decrease [4]. A significant decrease of the k_{12} was also observed in the presence of micellar solutions. Kinetic measurements indicated that, in addition to micellar interaction between morphine hydrochloride and sodium salts of bile acids, a complex may be also formed in chloroform via hydrogen bonds established between the drug and bile acid molecules. The work was financially supported by the Secretariat of Science and Technological Development, AP Vojvodina, Republic of Serbia, Grant No.114-451-2113/2011. Support for the NMR measurement time from the East-NMR Project No. 228461 is also acknowledged.

REFERENCES

- Kuhajda, M. Poša, V. Jakovljević, V. Ivetić, M. Mikov, Effect of 12-monoketocholeic acid on modulation of the analgesic action of morphine and tramadol, *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 34 (2009) 73-78.
- Poša, V. Guzsány, J. Csanádi, Determination of critical micellar concentration of two monoketo derivatives of cholic acid, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 74 (2009) 84-90.
- Poša, V. Guzsány, J. Csanádi, J. Borbás, F. Gaál, Study of Association of 12-Monoketocholeic Acid by ^1H NMR Relaxation Method, *Acta Chimica Slovenica* 56(4) (2009) 807-814.
- Poša, V. Guzsány, J. Csanádi, S. Kevrešan, K. Kuhajda, Formation of hydrogen-bonded complexes between bile acids and lidocaine in the lidocaine transfer from an aqueous phase to chloroform, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 34 (2008) 281-292.

SWELLING AND DRUG RELEASE PROPERTIES OF NAPROXEN-LOADED CA-ALGINATE MICROPARTICLES REINFORCED WITH CHITOSAN OLIGOSACCHARIDE

B. Calija¹, N. Cekic², S. Savic¹, B. Markovic³, J. Savic³, J. Milic¹

¹Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Serbia;

²DCP Hemigal, Leskovac, Serbia;

³Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Serbia

INTRODUCTION

Chitosan can be effectively used to improve stability and drug release properties of Ca-alginate microparticles. However, high molecular

weight and high viscosity of chitosan solutions hinder formation of polyelectrolyte complex (PEC) between chitosan and alginate [1,2]. Furthermore, high viscosity of chitosan solution affects spherical shape of microparticles, and microparticles formed in such environment tend to agglomerate permanently [3]. On the other hand, the hydrolyzed products - chitosan oligosaccharides (COS) are readily soluble in water and capable of forming low viscous water solutions due to shorter chain lengths and free amino groups in D-glucosamine units [4]. These advantages alongside with its polycationic nature propose COS as a potential crosslinking agent for Ca-alginate microparticles.

OBJECTIVES

We aimed to investigate the influence of COS on swelling characteristics and the *in vitro* drug release profiles of the Ca-alginate microparticles.

EXPERIMENTAL METHODS

Materials

Manugel GHB, sodium alginate with high guluronic acid content was kindly donated by FMC BioPolymer (USA). COS (molecular weight around 3 kDa and deacetylation degree >85%) was purchased from Fu Zhou Corona Science & Technology Development CO (China). Naproxen was provided by Chemo (Switzerland). All other chemicals and reagents were of analytical grade.

Methods

Microparticles preparation

Five different formulations of microparticles were prepared according to the well known two-step procedure using a custom made air-jet device (Table I) [3].

Code	stage I		stage II	
	Manugel % (w/w)	CaCl ₂ % (w/w)	COS % (w/w)	CaCl ₂ % (w/w)
F1	2	2	-	-
F2	2	2	0.1	2
F3	2	2	1	2
F4	2	2	2	2
F5	2	2	4	2

Table I. Composition of investigated microparticles formulation (F1-F5) treated and non-treated with COS.

SWELLING STUDIES

Swelling properties of the microparticles were determined by immersing the exact amount of dried microparticles in 20 ml of media solution: 0.1 M HCl (SGF) and USP phosphate buffer pH 6.8 (SIF) at 37°C. At specific time intervals microparticles were carefully removed from swelling media, blotted on filter paper to imbibe excess of water from surface and weighed immediately. Swelling ratio (SR) of each formulation was calculated from the equation: $SR = 100(W_t - W_i) / W_i$; where W_t is the weight of the swollen microparticles at time t and W_i is the initial weight of the microparticles.

IN VITRO DRUG RELEASE STUDIES

The release of naproxen from microparticles was performed using a DFZ 60 flow-through cell dissolution tester (Erweka, Germany) under a medium flow rate at 1 ml/min. SGF and SIF were used as dissolution media. At scheduled time intervals, samples were withdrawn, filtered

and assayed using Evolution 300 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, UK) at 330 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

As shown in Fig. 1, swelling ability of microparticles in SIF gradually decreased with increasing COS content, while in SGF the effect of COS was opposite. Furthermore, rapid swelling of Ca-alginate microparticles (F1) in SIF was followed by complete degradation for less than 2 h, while only F2 formulation among COS treated microparticles started to erode during 4 hours of experiment.

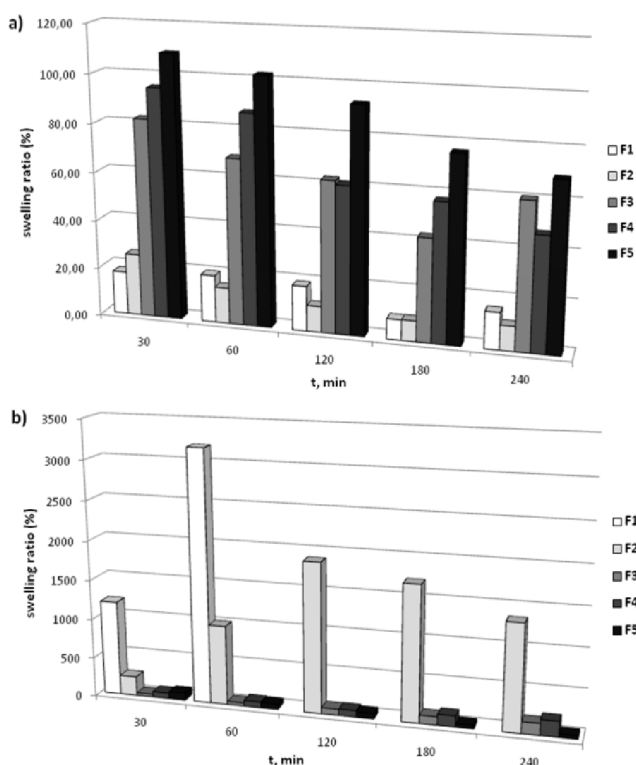


Figure 1. Swelling ratios of microparticles in: a) 0.1M HCl and b) phosphate buffer pH 6.8.

These results were in accordance with the results of drug release studies. In general, drug release was slow in SGF (Fig. 2a), with tendency to increase slightly with increasing COS content. In SIF (Fig. 2b), drug release was faster, decreasing with increased COS content in hardening solution up to 2% m/m (F4).

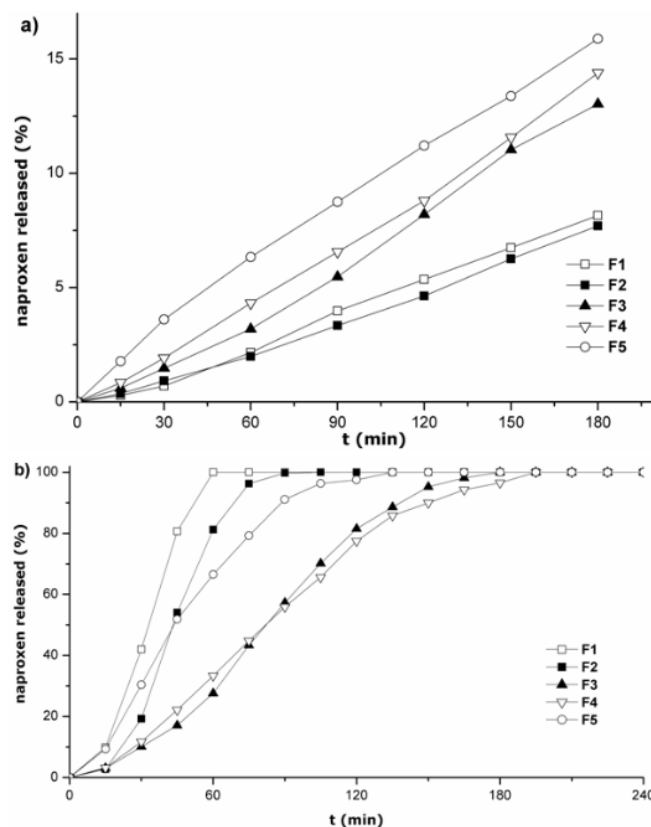


Figure 2. Naproxen release profiles from microparticles in: a) 0.1M HCl and b) phosphate buffer pH 6.8.

CONCLUSION

This study proved the COS as prospective effective crosslinking agent for improvement of Ca-alginate microparticles stability in SIF, allowing prolonged/delayed release of encapsulated drug.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was done under projects TR-34031 and OI-172041 supported by the Ministry of Education and Science, Republic of Serbia.

REFERENCES

- Polk, A., Amsden, B., Yao, K. D., Peng, T., Goosen, M. F. A., Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules. *J. Pharm. Sci.*, 83, 178-185 (1994).
- CY, C. Y., Zhang, X. C., Zhou, F. Z., Zhang, X. Z., Cheng, S. X., Zhuo, R. X., Sustained release of antineoplastic drugs from chitosan-reinforced alginate microparticle drug delivery systems. *Int. J. Pharm.*, 357, 15-21 (2008).
- Fernandez-Hervas, M. J., Holgado, M. A., Fini, A., Fell, J.T., In vitro evaluation of alginate beads of a diclofenac salt. *Int. J. Pharm.*, 163 23-34 (1998).
- Jeon, Y. J., Shahidi, F., Kim, S. K., Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods. *Food Rev. Int.*, 61, 159-176 (2000).

COMPARISON OF CHARACTERISTICS OF GRANULES AND TABLETS PRODUCED IN LOW SHEAR AND HIGH SHEAR GRANULATOR

Sunchica Jordanoska, Krume Toshev, Natasha A. Stojanovska, Ivana Mickoska, Tina Mitrulovska, Sonja Ugarkovic

Research and Development, ALKALOID AD, Aleksandar Makedonski 12, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

INTRODUCTION AND AIM

Wet granulation is still a very common process in the formulation of tablets. For drugs that lack compressible characteristics this method is preferred over direct compression. Nowadays, the high shear mixer is most often used in wet granulation. More conventional alternatives exist in forms that generate less shear and they are also still widely used. Experience has shown that a product's characteristics may be highly influenced by the type of granulation equipment used. Some parameters that are noted as mostly affected are bulk density, porosity and particle size of granules.

Our aim was to compare the effects of different type of granulator (low shear vs. high shear) on the control parameters of granules and tablets.

METHODOLOGY

This study was conducted in the facility of Research and Development, Alkaloid – AD. For our purpose, two formulations of tablets with high API content of cca 60% per tablet were made with the exact same composition (Fig. 1). The API has pKa value of 2.5 and belongs to BCS class IV. Formulation 1 was granulated in a low shear granulator - laboratory kneader (model: Erweka LK5) and a high shear mixer granulator (model: Diosna P 1/6) was used for the granulation of formulation 2 (Table 2). Afterwards the obtained wet granulates were milled in an oscillator mill (1.5 mm). Then the granulate 1 was dried in an oven. In comparison, granulate 2 was dried in a fluid-bed dryer. Both granulates were dried until a remaining moisture content of less than 10% was achieved. After the completion of the drying process the dry granulate was passed again through an oscillator mill (0.8 mm).

Function	Quantity per tbl. (%)
API	59.69
Filler	27.71
Binder	3.00
Disintegrant	8.94
Wetting agent	0.06
Lubricant	0.60

Table 1. Components of the formulations

Processing steps	Type of equipment used	
	Formulation 1	Formulation 2
Wet granulation	laboratory kneader (low shear)	high shear mixer granulator
Wet Screening	oscillator mill	oscillator mill
Drying	laboratory oven	fluid-bed dryer
Screening	oscillator mill	oscillator mill
Compressing	rotary tablet machine	rotary tablet machine

Table 2. Processing steps and type of equipment used for the formulations

RESULTS, DISCUSSION AND CONCLUSION

From each formulation a representative sample of the granules and tablets was taken and examined for the control parameters: bulk and tapped density, flow characteristics, porosity, particle size distribution of granules, hardness, thickness, and disintegration. A dissolution testing was also performed in media with two different pH values. The results are presented in Table 3:

Key control parameters				
Granulates				
	Formulation 1		Formulation 2	
Bulk density	0.639g/ml		0.732g/ml	
Tapped Density	0.730g/ml		0.832g/ml	
Hausner Ratio	1.14		1.14	
Carr index	12.5%		12%	
Flow Rate	39s/100g		29s/100g	
Angle of repose	35.1°		34.2°	
Porosity	60.69%		54.53%	
Particle size	<0.125mm=31.71%		<0.125mm=25.01%	
	<0.250mm=60.32%		<0.250mm=50.74%	
	<0.315mm=64.47%		<0.315mm=63.15%	
	<630mm=76.11%		<630mm=92.49%	
Tablets				
Hardness	19.78kp		16.16kP	
Thickness	4.62mm		4.56mm	
Disintegration	150s		90s	
Disolution in 6 time points (%)	pH 1.2	pH 4.5	pH 1.2	pH 4.5
5 min	23.15	66.49	19.03	71.04
10 min	38.12	89.23	29.94	85.78
15 min	49.81	94.39	36.28	89.72
20 min	58.37	96.26	40.09	91.75
30 min	67.90	98.14	46.03	93.94
45 min	75.71	99.31	51.64	95.74

Table 3. Key control parameters of granulates and tablets

The results show that the granules produced in a low shear granulator (formulation 1) are of lower bulk density and tapped density. The flow

characteristics are similar while the Hausner ratio and the Carr index remain the same for both formulations, which shows that the compressibility characteristics are not affected. The granules of formulation 1 are also of larger size than those of formulation 2, as shown with the comparison of the size distribution curves in Fig. 1. The porosity of the granules of formulation 1 is higher which results in faster dissolution of the API. The produced tablets under same tableting conditions from both formulations have similar hardness and thickness values. The disintegration is slower for formulation 1 while the dissolution is faster and is also shown to be pH influenced (Fig. 2, 3). This suggests that indeed changing the granulator could result in a difference in a product's final characteristics.

Fig. 1. Particle size distribution of granulates

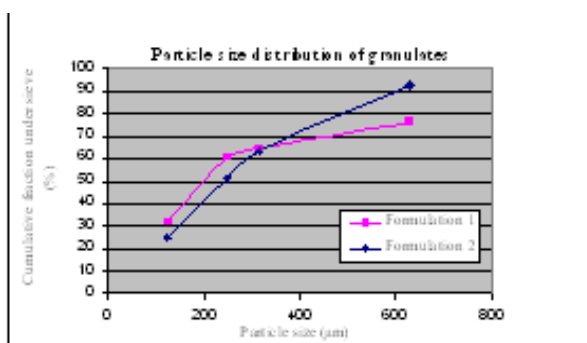


Fig. 2. Dissolution rate of API in pH=1.2

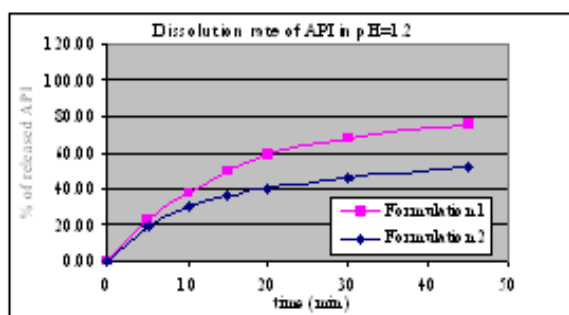
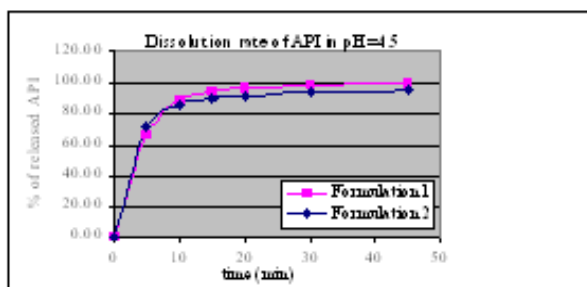


Fig. 3. Dissolution rate of API in pH=4.5



REFERENCES

- [1] DM Parikh, Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology, Marcel Dekker INC, New York, 1997.; 205-212.
- [2] DS Hausman, Comparison of low shear, high shear, and fluid bed granulation during low dose tablet process development. Drug Dev Ind Pharm. 2004; 30, (3): 259-66.
- [3] D Oulahna, F Cordier, L Galet, JA Dodds, Wet granulation: the effect of shear on granule properties, Powder Technology, 2003; 130, (1-3): 238-246.
- [4] <http://www.druginfosys.com/>

СПОРЕДБА НА КАРАКТЕРИСТИКИ НА ГРАНУЛИ И ТАБЛЕТИ ПРОИЗВЕДЕНИ СО LOW SHEAR И HIGH SHEAR ГРАНУЛАТОР

Сунчица Јорданоска, Круме Тошев, Наташа А.Стојановска, Ивана Мицкоска, Тина Митруловска, Соња Угарковиќ

Истражување и развој, АЛКАЛОИД АД, Александар Македонски 12, 1000 Скопје, Република Македонија

ВОВЕД И ЦЕЛ

Влажна гранулација е сè уште многу честа постапка при формулирање на таблети. За лекови кои немаат компресибилни карактеристики овој метод се претпочита пред директната компресија. Денес во влажната гранулација најчесто се користи high shear миксер. Постојат и повеќе конвенционални алтернативи кои генерираат помала брзина а исто така сè уште се користат. Искуството покажува дека карактеристиките на производот може да бидат под силно влијание на видот на опремата која се користи за гранулација. Некои параметри за кои е забележано дека се најмногу афектирани се насипна густина, порозност и дистрибуција по големина на гранули. Нашата цел беше да се споредат ефектите од различните видови на опрема за гранулација (high shear v.s. low shear гранулатор) на контролните параметри на гранули и таблети.

МЕТОДОЛОГИЈА

Оваа студија беше изведена во Истражување и Развој, Алкалоид АД - Скопје. За нашите цели беа направени две формулации на таблети со ист состав (Табела 1), со висока содржина на API од сса 60% pro таблета. Користената API има pKa вредност од 2,5 и припаѓа на BCS класа IV. Формулација 1 беше гранулирана во low shear гранулатор - лабораториска опрема за месече (модел: Erweka LK5), а за гранулација на формулацијата 2 беше користен high shear миксер гранулатор (модел: Diosna P 06/01) (Табела 2). Добиените влажни гранулати беа поминати низ осцилирачко ренде (1,5 mm). Потоа гранулат 1 е сушен во лабораториска сушница. За споредба, гранулат 2 е сушен во fluid-bed сушач. Двата гранулати беа сушени до постигнување на содржина на влага помалку од 10%. По завршувањето на процесот на сушење сувите гранулати повторно беа поминати низ осцилирачко ренде (0,8 mm).

Табела 1. Компоненти на формулации 1 и 2

Формулација	Компонент	Колитивна рачка (g)
1 и 2	API	59.69
	Поленител	27.71
	Брзувач	3.00
	Дезинтегранс	8.94
	Агенс за влажнење	0.06
	Лубриканс	0.60

Процесни чекори	Вид на користена опрема	
	Формулација 1	Формулација 2
Влажна гранулација	лабораториска машинa за месечење (low shear)	high shear миксер гранулатор
Влажно сеење	осцилаторско ренде	осцилаторско ренде
Сушење	лабораториска сушница	fluid-bed сушач
Сеење	осцилаторско ренде	осцилаторско ренде
Таблетирање	ротациона таблет машинa	ротациона таблет машинa

Табела 2. Процесни чекори и вид на опремата што се користи за формулациите 1 и 2

РЕЗУЛТАТИ, ДИСКУСИЈА И ЗАКЛУЧОК

Од секоја формулација беше земен репрезентативен примерок од гранулите и таблетите и испитан за контролните параметри: насипна и натапкана густина, проточни карактеристики, порозност, дистрибуција по големина на гранули, цврстина, висина и дезинтеграција. Исто така беше изведен и дисолуциски тест во два медиуми со различна pH вредност. Резултатите се прикажани во Табела 3:

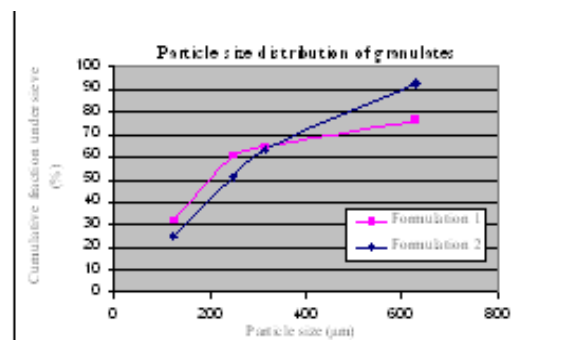
Клучни контролни параметри					
	Гранулати				
	Формулација 1	Формулација 2			
Насипна густина	0.639g/ml	0.732g/ml			
Натапкана густина	0.730g/ml	0.832g/ml			
Хауслет-ов однос	1.14	1.14			
Сарт-ов индекс	12.5%	12%			
Брзина на проток	3.9s/100g	2.9s/100g			
Агол на протекување	35.1°	34.2°			
Порозност	60.69%	54.53%			
Големина на честички	<0.125mm=31.71% <0.250mm=60.32% <0.315mm=64.47% <630mm=76.11%	<0.125mm=25.01% <0.250mm=50.74% <0.315mm=63.15% <630mm=92.49%			
Таблети					
Цврстина	19.78kP	16.16kP			
Висина	4.62mm	4.56mm			
Деинтеграција	150s	90s			
Дисолуција во временски точки (%)		pH 1.2	pH 4.5		
	5 мин	23.15	66.49	19.03	71.04
	10 мин	38.12	89.23	29.94	85.78
	15 мин	49.81	94.39	36.28	89.72
	20 мин	58.37	96.26	40.09	91.75
	30 мин	67.90	98.14	46.03	93.94
	45 мин	75.71	99.31	51.64	95.74

Табела 3. Клучни контролни параметри за гранулати и таблети

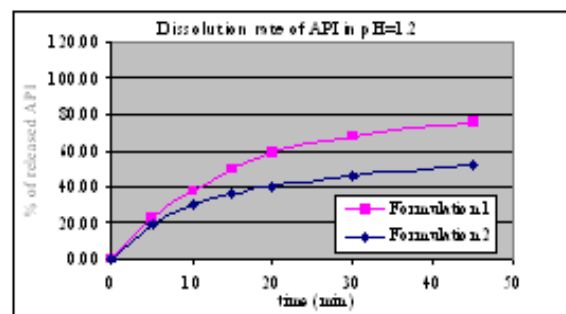
Резултатите покажуваат дека гранулите произведени во low shear гранулатор (формулација 1) се со пониска насипна и натапкана

густина. Проточните карактеристики се слични, а Hausner-овиот однос и Carr-овиот индекс остануваат исти за двете формулации, што покажува дека компресибилните карактеристики не се афектирани. Гранулите на формулацијата 1 се исто така поголеми од оние на формулацијата 2 што е прикажано преку споредба на кривите на дистрибуција по големина на Сл. 1. Порозноста на гранулите од формулацијата 1 е повисока, што резултира со побрза дисолуција на API. Произведените таблети од двете формулации, под исти услови на таблетирање, имаат слични вредности за цврстините и висините. Деинтеграцијата е побавна за формулацијата 1, а дисолуцијата побрза и pH-зависна (Сл. 2, 3). Ова укажува на тоа дека навистина промена на гранулаторот може да резултира со разлики во карактеристиките на конечниот производ.

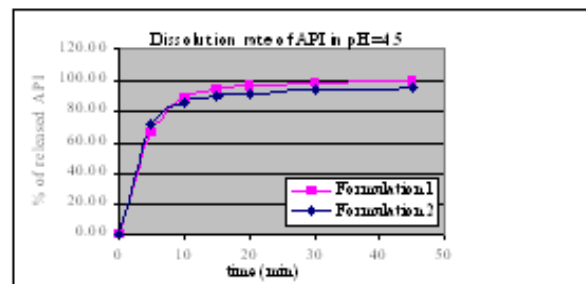
Сл. 1. Дистрибуција по големина на гранули



Сл. 2. Брзина на дисолуција на API во pH = 1,2



Сл. 3 Брзина на дисолуција на API API во pH = 4,5



ЛИТЕРАТУРА

- [1] DM Parikh, Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology, Marcel Dekker INC, New York, 1997.; 205-212
- [2] DS Hausman, Comparison of low shear, high shear, and fluid bed granulation during low dose tablet process development. Drug Dev Ind Pharm. 2004; 30, (3): 259-66.
- [3] D Oulahna, F Cordier, L Galet, JA Dodds, Wet granulation: the effect of shear on granule properties, Powder Technology, 2003; 130, (1-3): 238-246.
- [4] <http://www.druginfosys.com/>

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF PLGA AMPHIPILIC NANOPARTICLES AND SOLID TUMOR TARGETING

M. Simonoska Crcarevska¹, N. Geskovski¹, M. Glavas Dodov¹, S. Calis², S. Dimcevska¹, K. Goracinova¹

¹Faculty of Pharmacy, University of Ss Cyril and Methodius, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

²Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100Ankara, Turkey

Polymer therapeutics for cancer therapy is a promising field for development of alternative strategies to standardized chemotherapy treatment regime. Formulation relied on drug delivery technologies proficiently modify and control drug release profile, absorption, distribution and elimination for the benefit of improving product efficacy and safety, as well as patient convenience and compliance. Development of drug delivery systems (DDS) that would target the drug specifically and exclusively to tumor tissue, and at the same time would provide adequate drug release profile is major challenge in rationale design of innovative DDS for solid tumor targeting. Having in mind that passive targeting (Fig 1), utilizing the unique abnormalities associated with tumor tissue, is mostly used approach, special attention should be paid on the physico-chemical properties of the designed DDS. Size and surface of the nanoparticulate carrier play a very crucial role with respect to uptake by the tumour.

The present work is related to design and development of a model nanoparticulated DDS with tumour targeting ability. FDA approved synthetic polymers, Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (85:15) (PLGA) and polyethylene oxide (PEO) tri-block copolymer Pluronic F127 were used for formulation of the nanoparticles (NP). Irinotecan hydrochlorid (IR-HCl), water soluble substance was used as model drug substance.

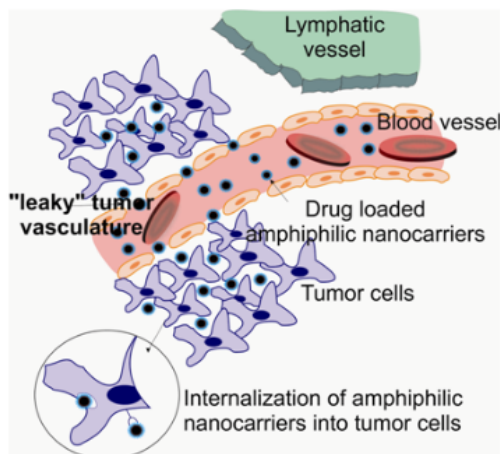


Fig. 1. Passive accumulation of drug-loaded nanoparticles in tumor tissues via the EPR effect

Having in mind that formulation of polymeric nanoparticles (NP) as carriers for hydrophilic drugs is problematic, since the drug is expelled from the hydrophobic matrix into the dispersing water phase during NP preparation, we faced our experiments towards modification of standard nanoprecipitation method (Fig. 2) [1, 2]

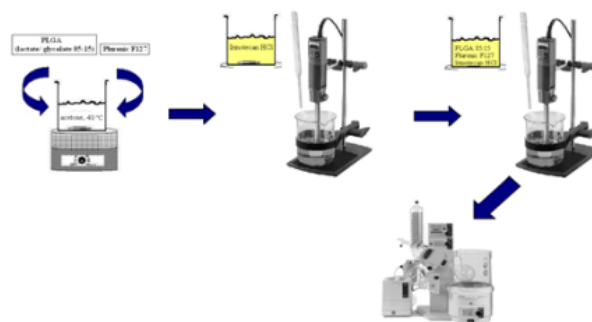


Fig 2. Schematic presentation of modified nanoprecipitation preparation procedure

Knowing the fact that mixing of two liquids mainly depends from differences in surface tension that have impact on mass exchange ratio and consequently would influence encapsulation efficiency (EE), the crucial step in modifying the nanoprecipitation procedure was selection of appropriate solvent for IR-HCl (ethanol acetonitrile, PEG-200, water). Implying that solubility of IR-HCl in all selected solvents was similar, obtained differences in EE are allegedly related to differences in surface tensions between drug solvent and polymer solvent. When water as drug solvent was used the highest EE (~50%) was obtained. Prospects for unique interaction of prepared NP with biological systems at molecular level are immense, since particle size of prepared NP (~ 120 nm) was in a required range of 20–200 nm. In fact, NP are large to avoid premature elimination via glomerular filtration in the kidneys, but are small enough to enter blood vessels and to capitalize on EPR effect for passive accumulation in the target tumor tissues [3]. Having in mind that low charged particles have a much lower opsonization rate than charged particles, measured zeta potential of NP (-1 to -5 mV) was in favor of prolonged blood circulation time and hence, EPR effect, thus postponing the time when NP would be recognized by reticuloendothelial system (RES) and hence, removed from the body. Also, to circumvent the problem associated with opsonization, the surface of nanoparticles must be sterically stabilized. This could be achieved by adsorption of Pluronic F127 onto the surface of NP. Presence of PEO chains on the surface of NP should reduce the amount of unspecific protein adsorption (opsonization) and is expected to drastically increase the blood circulation time and therefore to influence biodistribution of the particles. Using standard depletion method [4] amount of F127 incorporated and tightly bound to PLGA, was determined. Results indicated its dependency from the initial F127 quantity (0,28-0,83%) used during preparation procedure. Schematic presentation of odds on surface exterior of prepared NP is presented on Fig 3.

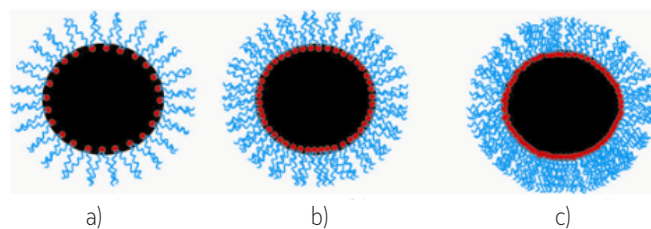


Fig.3. Schematic presentation of NP prepared with different quantity of F127 a) 0,28% F127; b) 0,55% F127 and c) 0,83% F127

By conducting adsorption studies with BSA [5], the influence of incorporated F127 into the NP on protein adsorption was determined,

and hence, possibility for opsonization was predicted. Future experiments will be directed to assessment and correlation of these results to the results from performed in vivo studies on healthy as well as tumor model animals. In fact by in vivo studies the influence of physico-chemical properties of prepared NP to solid tumor targeting performance would be evaluated.

REFERENCES

- [1] Glavas, M., Calis, S., Simonoska M., Geskovski, N., Goracinova, K. (2011). Colloidal carriers for anticancer drug delivery – formulation aspects, Proceedings of International Symposium on Drug Research and Development, Antalya, Turkey
- [2] Simonoska Crcarevska, M., Geskovski, N., Kuzmanovska, S., Glavas Dodov, M., Calis, S., Goracinova, K. (2011). Preparation and biological evaluation of irinotecan loaded biodegradable nanocarriers for tumour delivery by EPR effect, Proceedings of 3rd PharmSciFair, Prague, Czech Republic
- [3] Ebrahim Attia, A. B., Ong, Z. Y., Hedrick, J. L., Lee, P. P., Ee, P. L. R., Hammond, P. T., Yang, Y.Y. (2011). Mixed micelles self-assembled from block copolymers for drug delivery. *Curr Opin Colloid In*, 16: 182-194.
- [4] Shar, J. A., Obey, T. M., Cosgrove, T. (1998). Adsorption studies of polyethers Part 1. Adsorption onto hydrophobic surfaces. *Colloid Surface A* 136 (1-2): 21-33.
- [5] Schubert, M. A. and Muller-Goymann, C. C. (2005). Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier. *Eur J Pharm Biopharm* 61: 77-86.

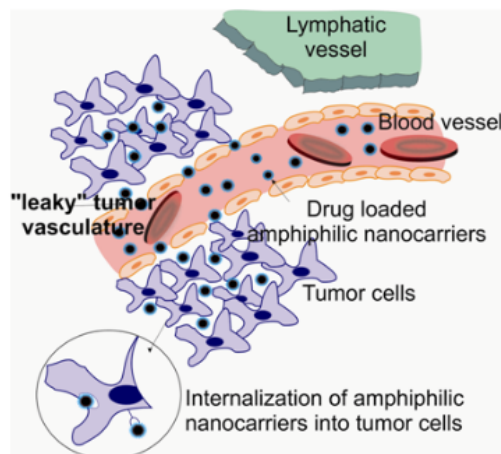
ФИЗИЧКО-ХЕМИСКИ ОСОБИНИ НА PLGA АМФИФИЛНИ НАНОЧЕСТИЧКИ И ТАРГЕТИРАЊЕ НА ЦВРСТИ ТУМОРИ

М. Симоноска Црцаревска¹, Н. Гешковски¹,
М. Главаш Додов¹, С. Чалиш², С. Димчевска¹,
К. Горачинова¹

¹Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“,
Водњанска 17, 1000 Скопје, Македонија

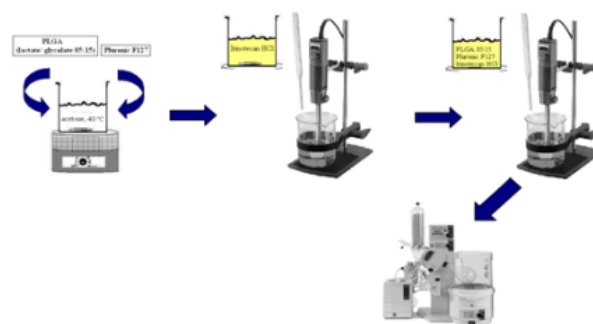
²Фармацевтски факултет, Хаџетепе Универзитет,
06100 Анкара, Турција

Полимерните терапевтици претставуваат ново широко поле за развој на алтернативни стратегии во терапијата на рак. Предизвик при формулацијата на дозирани форми со насочено и контролирано ослободување е да се дизајнираат системи (носачи) со соодветна количина на вграден лек, кои ќе можат ефикасно да поминуваат низ физиолошки бариери на патот до местото на делување, кои ќе имаат поголема ефикасност во терапијата, но и ќе покажат намалување на интензитетот и зачестеноста на потенцијалните нескани ефекти. Пасивниот таргетинг, кој се заснова на специфичните абнормалности асоцирани со туморното ткиво, претставува пристап во формулацијата на наноносачот кој овозможува да се намали фагоцитозата и/или да се продолжи времето на циркулација во системскиот крвоток. При тоа, посебно внимание треба да се посвети на физичко-хемиските особини на дизајнираните системи, т.е. големината на честичките и нивните површински особини. Целта на овој труд е дизајнирање и развој на нанопартикулиран систем (НП) за насочено и контролирано ослободување со особини кои ќе обезбедат ефикасно таргетирање на системот кон цврстите тумори. При формулацијата на НП беа употребени синтетски полимери Poly(D,L-lactide-co-glycolide) киселина (85:15) (PLGA) и polyethylene oxide (PEO) три-блок кополимер Pluronic F127 (F127). Како модел лековита супстанција е употребен иринотекан хидрохлорид (IR-HCl), водорастворлив лек.



Слика 1. Пасивен тумор таргетирање со НП системи со помош на ЕПР ефект

Инкорпорирањето на хидрофилен лек во полимерни НП е проблематично, бидејќи лекот многу брзо го напушта хидрофобниот матрикс и преминува во надворешната водена фаза. Со цел да се формулира ваков систем со ефикасно вграден лек, експериментите беа насочени кон модификација на стандардната нанопреципитациона метода. [1, 2]. Мешањето на две течности главно зависи од разликата во површинскиот напон, која пак има влијание на размената на маса меѓу фазите и соодветно на ефикасноста на енкапсулација (ЕЕ). Имајќи го ова во предвид, најважниот чекор при модификацијата на стандардната нанопреципитациона постапка е селекцијата на адекватен растворувач на IR-HCl (етанол, ацетонитрил, PEG-200, вода). Со оглед дека растворливоста на IR-HCl во сите избрани растворувачи е слична, добиените разлики во ЕЕ најверојатно се должат на разликите во површинскиот напон меѓу растворувачите на лекот и полимерот. Највисока ЕЕ (~50%) е добиена кога при употреба на вода како растворувач за IR-HCl.

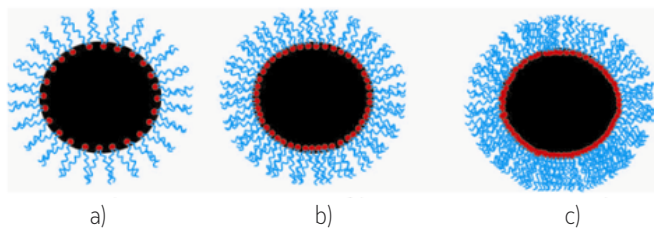


Слика 2. Шематски приказ на модифицираната нанопреципитациона метода

Со оглед дека големината на НП (~120 nm) е во бараните граници од 20–200 nm, постои голема веројатност за единствена и уникатна интеракција на подготвените НП со билошкиот систем на молекуларно ниво. Имено, ваквите честички се доволно големи да ја избегнат гломеруларната филтрација во бубрезите, и доволно мали да влезат во крвните садови и по пат на пасивен таргетинг да се акумулираат во туморот [3].

Со оглед дека честичките со мала површинска наелектризираност имаат многу помал степен на опсонизација во однос на наелектризираните честички, измерените вредности за зета потенцијалот на НП (-1 to -5 mV) се во прилог на продолженото време на

циркулација, и соодветно на ЕПР ефектот. Со цел да се заобиколи проблемот поврзан со опсонизацијата, површината на НП пожелно е да биде стерички стабилизирана. Ова може да се постигне со адсорпција на F127 на површината на НП. Присуството на PEO ланци на површината на НП треба да го намали степенот на неспецифична адсорпција на протеини (опсонизација) и драстично да го зголеми времето на циркулацијата, и соодветно акумулацијата во туморното ткиво. Количината на F127 која е вградена и цврсто врзана за PLGA, е определена со примена на методот на деплеција [4]. Резултатите укажаа на зависност од иницијалната количина на F127 (0,28-0,83%) употребена во текот на производството. Шематскиот приказ на најверојатниот површински изглед на подготвените НП е прикажан на Сл. 3.



Слика 3. Шематски приказ на НП подготвени со различни количини на F127 а) 0,28% F127; б) 0,55% F127 и в) 0,83% F127

Влијанието на вградиот F127 во НП на степенот на адсорпција на протеини е определено со помош на адсорпциски студии со BSA [5]. Понатамошните експерименти ќе бидат во насока на евалуација и корелација на овие резултати со резултатите добиени од *in vivo* студиите спроведени на здрави и/или тумор модел животни. Всушност *in vivo* студиите ќе овозможат евалуација на влијанието на физичко-хемиските особини на подготвените НП за таргетирање на цврстите тумори.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Glavas, M., Calis, S., Simonoska M., Geskovski, N., Goracinova, K. (2011). Colloidal carriers for anticancer drug delivery – formulation aspects, Proceedings of International Symposium on Drug Research and Development, Antalya, Turkey
- [2] Simonoska Crcarevska, M., Geskovski, N., Kuzmanovska, S., Glavas Dodov, M., Calis, S., Goracinova, K. (2011). Preparation and biological evaluation of irinotecan loaded biodegradable nanocarriers for tumour delivery by EPR effect, Proceedings of 3rd PharmSciFair, Prague, Czech Republic
- [3] Ebrahim Attia, A. B., Ong, Z. Y., Hedrick, J. L., Lee, P. P., Ee, P. L. R., Hammond, P. T., Yang, Y.Y. (2011). Mixed micelles self-assembled from block copolymers for drug delivery. *Curr Opin Colloid In*, 16: 182-194.
- [4] Shar, J. A., Obey, T. M., Cosgrove, T. (1998). Adsorption studies of polyethers Part 1. Adsorption onto hydrophobic surfaces. *Colloid Surface A* 136 (1-2): 21-33.
- [5] Schubert, M. A. and Muller-Goymann, C. C. (2005). Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier. *Eur J Pharm Biopharm* 61: 77-86.

^{99m}Tc RADIOLABELING OF NANOPARTICLES FOR BIODISTRIBUTION AND EFFICACY STUDIES

Geskovski N., Kuzmanovska S., Simonoska Crcarevska M., Glavas Dodov M., Kocovska Zdraveska M., Goracinova K.

¹ Institute of Pharmaceutical technology, Faculty of Pharmacy-Skopje

² Institute of Patophysiology and Nuclear Medicine, Faculty of Medicine-Skopje

INTRODUCTION AND AIM

The rapid removal of intravenously administered colloidal drug carriers by the mononuclear phagocytic system (MPS), comprising mainly the Kupffer cells of the liver and the macrophages of the spleen has been identified as the major obstacle to the efficient targeting of colloidal carriers to target sites such as the circulation itself, tumors, sites of inflammation, and the bone marrow [1]. Introducing the biodistribution studies as evaluation tool in early development stages of long circulating nanoparticulated carriers will point out the key properties that influence its behavior in an *in vivo* environment thus enabling efficient formulation optimization towards the desired effect. One of the most suitable methods of studying the biodistribution is to label these nanoparticles with ^{99m}Tc and to measure their radioactivity in various tissues or to perform gamma imaging of the whole body after their administration. The starting material for technetium nucleus is pertechnetate ions, which are usually reduced by acidic stannous chloride or other stannous salts, although other reducing agents are also often used. There have been few reports on the biodistribution studies of ^{99m}Tc labeled nanoparticles and in all these studies stannous chloride has been used as a reducing agent for reduction of Tc (VII) ions. In these studies, major liver uptake as well as rapid blood clearance of radiolabeled nanoparticles were reported. However Banjaree et al. stated that stannous chloride and other stannous salts, when used as reducing agents, lead to the formation of colloidal tin (IV) oxide particles that can significantly alter the biodistribution profile of the prepared nanoparticles [2]. The aim of the present work was to develop ^{99m}Tc radiolabeling method for amphiphilic nanocarriers using different reducing agents and evaluate its efficacy with suitable *in vitro* and *in vivo* tests.

MATERIALS AND METHODS

The preparation of the PLGA amphiphilic nanoparticles was described elsewhere [3]. Nanoparticles were radiolabeled with Technetium- ^{99m}Tc (^{99m}TcO⁴⁻) obtained by elution from ⁹⁹Mo-^{99m}Tc generator. In order to reduce the pertechnetate anion we used three different reducing agents stannous chloride (SnCl₂), sodium borohydride (NaBH₄) and sodium dithionite (Na₂S₂O₄), the latter two doesn't form colloidal particles i.e. their oxidized form is soluble ion. We evaluated the radiochemical purity and stability of formed complexes separately for each reduction agent.

The labeling efficiency of ^{99m}Tc to prepared nanoparticles was assessed by ascending instant thin layer chromatography (ITLC) using silica gel coated fiber sheets. (Merck KGaA, Germany). The ITLC was performed using acetone as the mobile phase. Radiochromatograms were obtained with a scanner VCS-101, Veenstra Instruments, USA and the percentage of free pertechnetate was calculated from the regions of interest with the VCS-103 Software, version 1.06.

In vivo biodistribution studies were performed on female Wistar rats (aged 4-6 weeks, weighing ~200g). The animals were injected at random in the tail vein with 0.3 ml radiolabeled NP dispersion (1.5mg polymer per rat, ~0.4 mCi). After 1h, the animals were sacrificed and their tissues (liver, spleen, lungs, muscle, bone (femur of left hind leg), intestines, kidney, heart, stomach, intestines and thyroid) were excised, washed quickly with cold water to remove surface blood and counted for radioactivity in a well-type gamma scintillation counter (Ecko Electronics, USA). The radioactivity remaining in the tail was also measured and taken into consideration in the calculation of total radioactivity dose administered to the rat. Also, images of tissue distribution of nanoparticles were acquired using E-Cam Single Head gamma camera (Siemens, Germany).

RESULTS AND DISCUSSION

The labeling efficacy of nanoparticles with ^{99m}Tc was 94.7, 93.1% and 60.2% for SnCl₂, Na₂S₂O₄ and NaBH₄, respectively (Fig.1). These results indicate the lack of reducing potential of NaBH₄ in the labeling procedure affecting the stability of the formed complex.

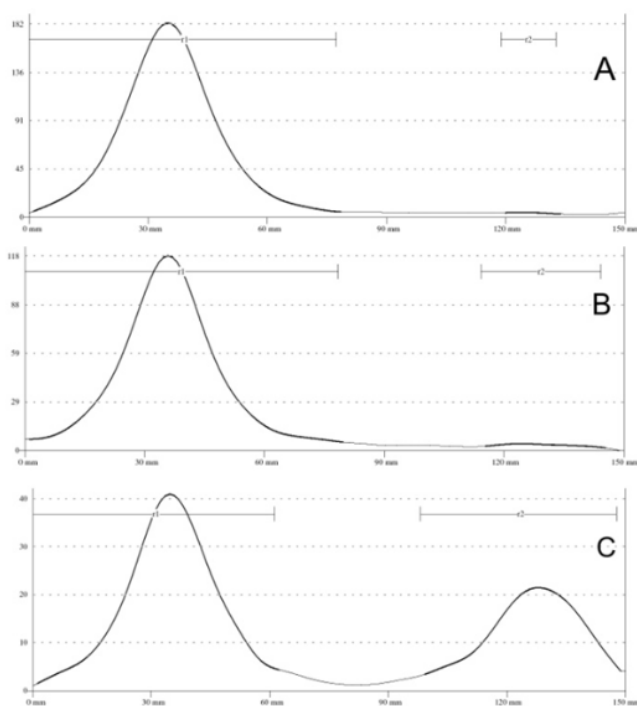


Figure 1. ITLC Chromatograms from the samples after the radiolabeling procedure with: A. SnCl₂, B. Na₂S₂O₄ and C. NaBH₄

Biodistribution studies also marked the differences between the complexes formed in the various labeling procedures. *In vivo* studies of the radiolabeled nanoparticles using NaBH₄ as a reducing agent produced high radioactivity in the soft tissues (stomach, intestines) and thyroid gland probably due to the specific affinity of the free ^{99m}Tc. Labeled nanoparticles with SnCl₂ showed exclusive immediate uptake from the liver (1h interval, Fig. 2) regardless of the formulation changes. This result is in correspondence with the one published by Banjaree et al. thus confirming the interfering role of colloidal tin oxide in the radiolabeling procedure.

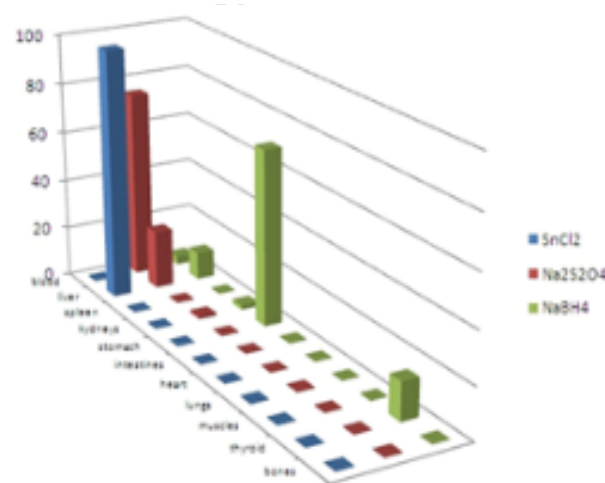


Figure 2. Biodistribution of NP (1h post injection) radiolabeled using different reducing agents

The high stability of the complex and the absence of colloidal particles in the labeling process using Na₂S₂O₄ resulted in high radioactivity in blood compared to the liver and spleen which reflects the real *in vivo* behavior of the amphiphilic nanoparticles.

CONCLUSION

In this study we developed efficient and rapid radiolabeling procedure for long circulating colloidal drug carriers thus enabling conduction of interference-free biodistribution and efficacy studies.

REFERENCES

1. Dunn,S.E., Coombes,A.G.A., Garnett,M.C., Davis,S.S., Davies,M.C., Illum,L., 1997. Journal of Controlled Release, 44, 65-76.
2. Banerjee,T., Singh,A.K., Sharma,R.K., Maitra,A.N., 2005. International Journal of Pharmaceutics, 289, 189-195.
3. Crcarevska Simonoska M., Glavas Dodov M., Calis S., Petrovska V., Geskovski N., Goracinova K., 2010. Abstractbook of 15th International Pharmaceutical Technology Symposium IPTS 2010. P53, 149-151.

РАДИОМАРКИРАЊЕ НА НАНОЧЕСТИЧКИ СО ^{99m}Tc ЗА ИЗВЕДУВАЊЕ НА СТУДИИ НА БИОДИСТРИБУЦИЈА И ЕФИКАСНОСТ

Гешковски Н., Кузмановска С., Симоноска Црцаревска М., Главаш Додов М., Кочовска Здравеска М., Горачинова К.

¹Институт за Фармацевтска Технологија, Фармацевтски Факултет-Скопје

²Институт за Патофизиологија и Нуклеарна Медицина - Медицински Факултет, Скопје

ВОВЕД И ЦЕЛ

Главна пречка во ефикасното насочување на интравенски администрираните колоидни носачи претставува брзото превземање од мононуклеарниот фагоцитен систем, кој главно е составен од Купферовите клетки во црниот дроб и макрофагите во слезенката [1]. Воведувањето на студиите на биодистрибуција во раните фази на оптимизација на долгоциркулирачките нанопартикулирани системи

би овозможило идентификација на клучните параметри кои влијаат врз однесувањето на формулацијата во *in vivo* средина со цел насочување на оптимизацијата кон постигнување на посакуваниот ефект. Радиомаркирањето на наночестичките со ^{99m}Tc и следење на радиоактивноста по органи или снимање на гама камера по апликација представува една од најсоодветните методи за следење на биодистрибуцијата. Редукцијата на пертехнетатниот анјон е предуслов за ефикасно радиомаркирање. Како средства за редукција најчесто се користат солите на калај. Низ литературата може да се сретнат неколку примери на студии на биодистрибуција на наночестички радиомаркирани со ^{99m}Tc со користење на калај хлорид како средство за редукција. Притоа, истите пријавуваат доминантно превземање од црниот дроб и брз клиренс од циркулацијата. Ванјареа и соработниците демонстрираат дека употребата на калај хлорид и други соли на калај како средства за редукција при радиомаркирање на наночестички може значително да влијаат на профилот на биодистрибуција заради формирањето на колоидни честички од калај (IV) оксид при самата постапка на радиомаркирање [2]. Целта на овој труд е развој на метод за радиомаркирање на амфибилни наночестички со ^{99m}Tc со користење на различни средства за радиомаркирање и негова евалуација со соодветни *in vitro* и *in vivo* тестови.

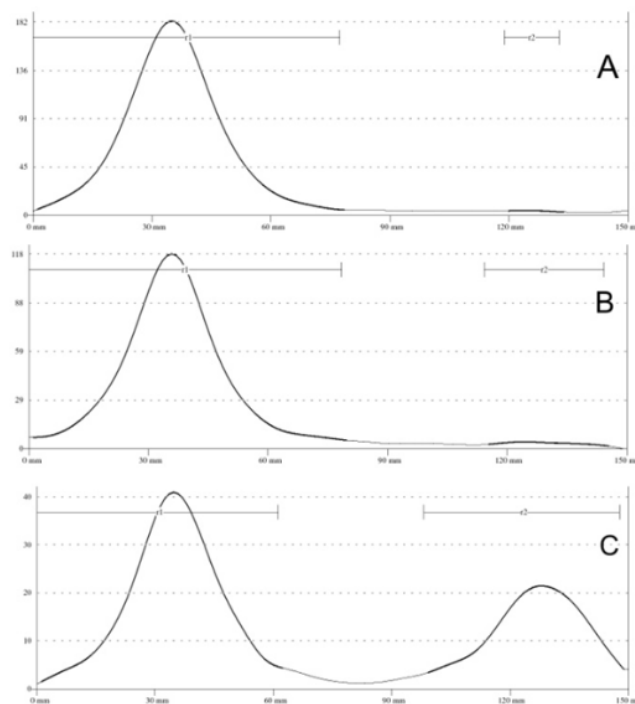
МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Подготовката на PLGA (poly lactic-co-glycolic acid) амфибилни наночестички е претходно публикувана [3]. Наночестичките бае радиомаркирани со Technetium- $^{99m}\text{TcO}_4^-$ елуиран од ^{99}Mo - ^{99m}Tc генератор. За редукција на пертехнетатниот анјон беа искористени три различни средства за редукција: калај хлорид (SnCl_2), натриум борхидрид (NaBH_4) и натриум дитионит ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), од кои последните два не формираат колоидни честички т.е. нивната оксидирана форма е растворлив јон.

Ефикасноста на радиомаркирање на наночестичките беше определена со користење на инстант тенкослојна хроматографија (ITLC) на ленти обложени со силика како стационарна фаза и ацетон како мобилна фаза (Merck KGaA, Germany). Радиохроматограмите се снимаа на скенер (VCS-101, Veenstra Instruments, USA), додека процентот на слободен пертехнетат се пресметуваше од површината под регионите на интерес со помош на софтвер VCS-103 Software, version 1.06. Студиите на биодистрибуција се работеа на Wistar стаорци, 4-6 недели стари со маса ~200g. 0.3 ml од радиомаркираните наночестички (1.5mg полимер, ~0.4 mCi) се аплицираат во опашната вена. По 1 час со кардијална пункција се вади 1ml крв, животните се жртвуваат, се екстрахираат црниот дроб, слезенката, срцето, белите дробови, бубрезите, тироидеата, желудникот и делови од цревата, мускулите и коските. Истите се промиваат, вагаат по што им се одредува радиоактивноста на гама сцинтилациски бројач (Ecko Electronics, USA). Радиоактивноста во опашот исто така се зема в предвид при пресметката на апсолутната радиоактивност. На дел од стаорците се прават снимки на гама камера (Siemens, Germany).

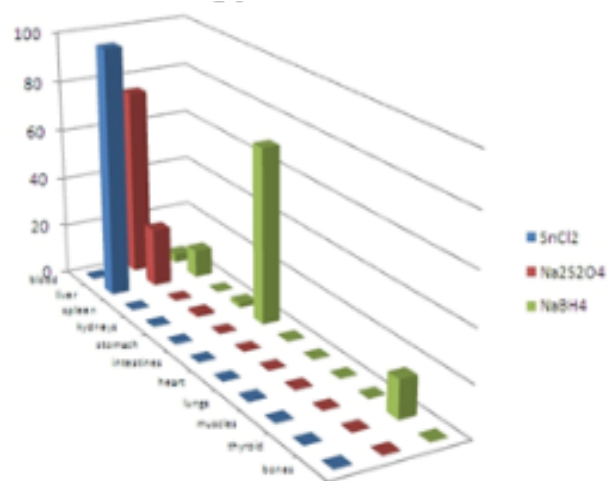
РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Ефикасноста на радиомаркирање на наночестичките со ^{99m}Tc беше 94.7 за SnCl_2 , 93.1% за $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ и 60.2% за постапката NaBH_4 (Слика 1). Од резултатите може да се заклучи дека слабиот редукциски потенцијал на NaBH_4 во постапката на радиомаркирање влијае на финалната стабилност на комплексот.



Слика 1. ITLC Хроматограми на примероци од радиомаркирање со: А. SnCl_2 , В. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ and С. NaBH_4

Студиите на биодистрибуција ги потврдија разликите во стабилноста на комплексите добиени од различните постапки на радиомаркирање т.е. истите покажаа висока радиоактивност во меките ткива и тироидната жлезда кај наночестичките маркирани со NaBH_4 како средство за редукција, најверојатно заради специфичниот афинитет на слободниот ^{99m}Tc . Наночестичките маркирани со посредство на SnCl_2 покажаа брзо превземање од црниот дроб (Fig. 2). Овие резултати кореспондираат со тие објавени од Ванјареа и соработниците со што се потврдува интерферирачката улога на колоидниот калај оксид во постапката на радиомаркирање.



Слика 2. Графички приказ на биодистрибуција на маркираните наночестички со различни средства за редукција (1ч по апликација)

Високата стабилност на комплексот како и отсуството на колоидни честички при постапката на радиомаркирање посредувана од $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ резултираше со висока радиоактивност во крвта (во првиот час) споредено со црниот дроб и слезенката што всушност

го рефлектира реалниот биодистрибуциски профил на амфирилните наночестички.

ЗАКЛУЧОК

Како дел од оваа студија беше развита брза и ефикасна метода на радиомаркирање на долгоциркулирачки наночестички која може да се употреби во студии на биодистрибуција и ефикасност.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. Dunn,S.E., Coombes,A.G.A., Garnett,M.C., Davis,S.S., Davies,M.C., Illum,L., 1997. Journal of Controlled Release, 44, 65-76.
2. Banerjee,T., Singh,A.K., Sharma,R.K., Maitra,A.N., 2005. International Journal of Pharmaceutics, 289, 189-195.
3. Crcarevska Simonoska M., Glavas Dodov M., Calis S., Petrovska V., Geskovski N., Goracinova K., 2010. Abstractbook of 15th International Pharmaceutical Technology Symposium IPTS 2010. P53, 149-151.



**ФАРМАЦЕВТСКА
ТЕХНОЛОГИЈА
И БИОФАРМАЦИЈА**

постер презентации

**PHARMACEUTICAL
TECHNOLOGY AND
BIOPHARMACY**

poster presentations

DEPYROGENATION VALIDATION

Silvana Ilioska-Zlatanovic¹, Elizabeta Popovska¹,
Hristina Babunovska¹, Maja Simjanovska¹, Dzoko
Kungulovski²

¹ALKALOID A. D, Blvd. A. Makedonski 12, 1000 Skopje, R.Macedonia
²Faculty of Natural Science and Mathematics, Gazi Baba bb, Skopje
1000, R.Macedonia

INTRODUCTION

Pyrogens are fever-inducing substances. They are classified as exogenous and endogenous pyrogens, upon their origin from outside or inside the body. Exogenous pyrogen is any substance, foreign to the body, capable of inducing a febrile response upon injection or infection. The most potent pyrogen is endotoxin. Endotoxin occurs in the outer membrane of a dual layered, asymmetrical shell that protects gram-negative bacteria from their environment. Endotoxin is a concern for animals and people only when it comes into contact with the circulatory system via medically invasive techniques, including injection or infusion of parenteral solutions. Depyrogenation is process of inactivation or removal of the pyrogens. Dry heat depyrogenation is often the agent of choice in the pharmaceutical industry for depyrogenating items which will tolerate relatively high temperatures, such as glassware.

OBJECTIVE

The aim of our study is to validate the process of depyrogenation in the depyrogenation tunnels at our sterile production facility, Baush-Strobel AWU8004DHT2547 and RUR D07 H.Strunk.

MATERIALS AND METHOD

We evaluated the depyrogenation process on glassware from 1ml, 2ml, 5ml and 10ml, using the LAL test, Kinetic-turbidimetric method. After cycle completion, the log reduction in endotoxin levels were determined by comparing the endotoxin levels in the baked vs non-baked control ECV.

RESULTS AND DISCUSSION

The log reduction from depyrogenation tunnel for glassware of 1ml was minimum 4.4977, for glassware of 2ml was min 4.2511 log reduction, for glassware of 5ml was min 4.5475 log reduction and the min log reduction for glassware of 10ml was 4.420.

CONCLUSION

Log reduction for all examined items was bigger than 3. It confirms the successful depyrogenation with dry heat in compliance with pharmacopean regulations. We hereby confirm that the dry heat is a effective method for depyrogenation of materials resistant to heat. Kinetic-Turbidimetric method for assessment of bacterial endotoxin is a method of choice due to its simplicity and significant sensitivity.

REFERENCES

- Carleton FJ., Agalloco JP., 1999. Validation of pharmaceutical processes, Marcel and Dekker.
European Pharmacopeia, 2008. 6.0 Volume 1, (5.1.1, 5.1.2 and 5.1.5), Council of Europe-Strasbourg.
Guidline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an end product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, 2001. Biological Products, and Medical Devices. US Food and drug administration.
Ludwig JD., Avis KE., 1990. Dry heat inactivation of endotoxin on the surface of glass, J. Parenter. Sci. Technol., p. 4-12.
Tsujii K., Lewis AR., 1978. Dry heat destruction of lipopolysaccharide: Mathematical

approach to process evaluation, Appl. Environ. Microbiol., p. 715-719.
US Pharmacopeia, 2010. NF 28, Volume 1, The United States pharmacopeial Convention, Rockville.

Williams K., 2009. ed Endotoxins: Pyrogens, LAL testing and Depyrogenation, Drugs and the pharmaceutical sciences Vol. 167, Informa healthcare.

ВАЛИДАЦИЈА НА ПРОЦЕС НА ДЕПИРОГЕНИЗАЦИЈА

Силвана Илиоска-Златановиќ¹, Елизабета Поповска¹, Христина Бабуновска¹, Маја Симјановска¹, Џоко Кунгуловски²,

¹АЛКАЛОИД А. Д, Бул. А. Македонски 12, 1000 Скопје, Македонија
²Природно-Математички Факултет, Гази Баба бб, Скопје 1000, Македонија

ВОВЕД

Пирогени се супстанции кои предизвикуваат покачена телесна температура. Се делат на езогени и ендогени, во зависност од тоа дали потеклото им е од надворешната средина или од живиот организам. Најмоќен пироген од сите е ендотоксинот, кој е составен дел на надворешната двослојна обвивка која ги штити Грам негативните бактерии од околната средина.

Ендотоксинот го доведува во опасност живиот организам само ако дојде во контакт со неговиот циркулаторен систем преку медицински инвазивни методи, вклучувајќи инјекции или инфузии на парентерални раствори.

Депирогенизација е процес на инактивација или одстранување на пирогените, а со тоа и на ендотоксините. Сувата топлина е најчест метод на избор во фармацевтската индустрија за депирогенизација на материјали кои толерираат високи температури, како што е стаклото.

ЦЕЛ

Целта на студијата е да се валидира процесот на депирогенизација во тунели за депирогенизација: Baush-Strobel AWU8004DHT2547 и RUR D07 H.Strunk.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОД

При испитувањето следен е процесот на депирогенизација на стаклена амбалажа-ампули со волумен од 1ml, 2ml, 5ml и 10ml за полнење на стерилни производи. За одредување на концентрацијата на ендотоксини, користен е ЛАЛ тестот со Турбидиметриски-кинетички метод, според важечките фармакопеи. Логаритамската редуција на ендотоксинската концентрација одредувана е споредувајќи ги ендотоксинските вредности во процесираниите и непроцесираните, контролни ECV.

РЕЗУЛТАТИ

За тунелите за депирогенизација на стаклени ампули добиени се следните резултати: за депирогенизација на ампули од 1ml одреден е минимум од 4.4977 log редуција, за стаклени ампули од 2ml минимум 4.2511 log редуција, за стаклени ампули од 5ml минимум 4.5475 log редуција и за стаклени ампули од 10ml минималната log редуција е 4.420.

ЗАКЛУЧОК

Log редуција на ендотоксинската концентрација измерена во сите

ECV е поголема од 3, со што се задоволуваат фармакопејските прописи. Со тоа е потврдена успешноста на валидацијата на процесот на депирогенизација со сува топлина.

ЛИТЕРАТУРА:

- Carleton FJ., Agalloco JP., 1999. Validation of pharmaceutical processes, Marcel and Dekker.
- European Pharmacopoeia, 2008. 6.0 Volume 1, (5.1.1, 5.1.2 and 5.1.5), Council of Europe- Strasbourg.
- Guidline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an end product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, 2001. Biological Products, and Medical Devices. US Food and drug administration.
- Ludwig JD., Avis KE., 1990. Dry heat inactivation of endotoxin on the surface of glass, J. Parenter. Sci. Technol., p. 4-12.
- Tsuji K., Lewis AR., 1978. Dry heat destruction of lipopolysaccharide: Mathematical approach to process evaluation, Appl. Environ, Microbiol., p. 715-719.
- US Pharmacopoeia, 2010. NF 28, Volume 1, The United States pharmacopeial Convention, Rockville.
- Williams K., 2009. ed Endotoxins: Pyrogens, LAL testing and Depyrogenation, Drugs and the pharmaceutical sciences Vol. 167, Informa healthcare.

THE IMPORTANCE OF MONITORING POLYMORPHIC FORMS OF PHARMACEUTICAL SOLIDS

Gordana Zigic, Svjetlana Mihaljica, Vesna Poprzen

Medicines and Medical Devices Agency of Serbia

Polymorphism is defined as the ability of a compound in the solid state to exist in different crystalline forms having the same chemical composition. Substances that exist in a non-crystalline solid state are said to be amorphous. The term pseudopolymorphism is used to describe solvates (including hydrates), where a solvent is present in the crystal matrix in a stoichiometric proportions.

In this study the influence of different polymorphic forms of an active pharmaceutical ingredient (API) on quality, safety, and efficacy of the drug product is discussed and the general principles applied in monitoring and control of polymorphs from the regulatory point of view are presented.

Control of the physical form of the API is very important because physicochemical differences in polymorphic forms of the same active substance could, in some cases, affect the drug product characteristics such as stability, dissolution profile, and bioavailability. Thus, polymorphism can affect the quality, safety, and efficacy of the drug product. Active substance polymorphic forms can also exhibit different physical and mechanical properties, including hygroscopicity, particle shape, density, flowability, and compactibility, which in turn may affect processing of the drug substance and/or manufacturing of the drug product.

It is the goal in pharmaceutical manufacturing to produce the drug substance or to formulate the drug substance in a manner that it remains in the same phase-pure state during the manufacture and subsequent storage of the drug product. Polymorphic forms of the API can undergo phase conversion when exposed to extreme conditions (extensive mechanical and thermal stress and exposure to solvents) used in different steps of the manufacturing process, such as drying, milling, micronization, wet granulation, spray-drying, and compaction. Exposure to environmental conditions such as humidity and temperature during the storage can also induce polymorph conversion.

For these reasons the use of suitable techniques for the physical characterization of polymorphic forms of pharmaceutical solids is very important. There are plenty of analytical techniques available to characterize pharmaceutical solids and solid-state transformations, which are applied in various stages during the whole life span of a drug product, including development, stability studies, and post-approval management stage. The following techniques are frequently used in polymorphism studies: X-ray diffraction (X-ray powder diffraction, single crystal X-ray diffraction), thermal methods of analysis (differential scanning calorimetry, thermogravimetry, thermal microscopy), solid-state nuclear magnetic resonance spectrometry, vibrational spectroscopy (infrared absorption spectroscopy, Raman spectroscopy, near-infrared spectroscopy), moisture absorption analysis, and optical and electronic microscopy.

Obtained results on polymorphism investigation of the API are included in marketing authorization documentation of medicines. Depending on whether polymorphism is exhibited by the drug substance, whether the polymorphic forms have different properties (solubility, stability, melting point), and finally if the different polymorphs can affect the drug product quality, efficacy and/or safety, the polymorphic forms identification and quantification tests should be included in the active substance specification. In some cases, when drug product performance testing (e.g. dissolution testing) does not provide adequate control if polymorph ratio changes for poorly soluble APIs that can influence drug product bioavailability, it is necessary to set specifications for polymorphs in drug products as well. In such instances, control of polymorphs is usually done during the stability study of solid oral dosage forms or oral suspensions. Polymorphs are unlikely to have a significant effect on bioavailability when all forms have the same apparent solubilities or all forms are highly soluble.

It can be concluded that the physical form of an API might have a great impact on bioavailability and as a consequence on drug product performance. For this reason, control of physical purity of both the API itself and the API in the formulated product is of utmost importance during different stages of drug development. The choice of analytical techniques used for the qualitative and quantitative analysis of different crystalline forms should be made on a case by case basis. The use of combined techniques is recommended since the comprehensive characterization of the physical properties of pharmaceutical active substances often requires a multi-disciplinary approach.

REFERENCES

1. European Pharmacopoeia (PhEur), 7th ed., 2011, p. 649
2. S. Ahuja and K.M. Alsante (Ed.), Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals, Vol.5, Separation Science and Technology, Academic Press, San Diego, USA, 2003, p. 39-69
3. ICH Topic Q6A: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances (CPMP/ICH/367/96), EMEA, May 2000
4. D. Giron, Investigations of polymorphism and pseudo-polymorphism in pharmaceuticals by combined thermoanalytical techniques, J. Therm. Anal. Cal., Vol. 64 (2001) 37-60
5. N. Chieng, T. Rades and J. Aaltonen, An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs, J. Pharm. Biomed. Anal. Article in Press, Available online 22 December 2010
6. Guidance for Industry, ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism, Chemistry, Manufacturing, and Controls Information, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER, July 2007
7. R. Hilfiker (Ed.), Polymorphism in the Pharmaceutical Industry, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2006, p. 15, 117

RISK ANALYSIS AS AN EFFICIENT TOOL FOR AUDIT OF STARTING MATERIAL SUPPLIERS

Borche Stamatovski, Miroslav Popovski, Miroslava Ilievska, Maja Velinovska-Cadinovska, Katerina Aleksievska Beldedovska.

ALKALOID AD Skopje, Pharmaceutical, Chemical and Cosmetics Company, Boul. Aleksandar Makedonski 12, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

INTRODUCTION

Suppliers are legal subjects (companies or persons) that deliver or produce raw materials or packaging materials, or perform services for the client company. Qualified Supplier is a supplier that meets high quality standards, based on its: preliminary assessment, review of retrospective data, certificate of inspection carried out by regulatory authority, conducted audit of its production facilities and quality / environment system and the successful fulfillment of the required criteria. The qualification of suppliers is carried out to determine their ability to deliver materials in accordance with the legal regulations for the appropriate materials and the quality requirements [1]. The regulatory requirements for active pharmaceutical ingredients (API) are the most demanding so it is expected from the manufacturers of medicines for human use to perform evaluation of its API manufacturers through regular audits of their manufacturing facilities [2]. According to the Directive of the European Parliament and Council [3], the manufacturer of medicines for human use must use active substances (in some cases this also applies for excipients) that are produced according to the requirements of good manufacturing practice (GMP) [4]. A similar attention should be given to the supply, handling and control of the primary and secondary packaging materials as that of active substances and excipients [5]. The user of the starting materials should take into account the supplier's reliability, previous quality of the supplied material or service, and should assess the quality system and production conditions [6].

SCOPE

Taking into account the regulatory requirements and expectations, Alkaloid AD has established a system of risk assessment as a tool for simple and efficient planning of supplier audits, for the new and existing suppliers, while following the recommendations given in the guidelines for risk management [7].

The main scope of this paper is to present the process of audit planning for the numerous suppliers of Alkaloid AD and to highlight the benefits from such audits.

METHODS

According to the recommendations given in the guidelines for risk management [7] and the criteria set for risk analysis of suppliers, a three-year plan (2009, 2010 and 2011) for audit was prepared. Five criteria were set that relate to quality of material / service provided by the supplier, previous regulatory inspections, and prior audits conducted by Alkaloid AD. According to the criteria, suppliers are classified into three groups: low, medium and high risk. High-risk suppliers are planned for audit in the first year, medium-risk suppliers are planned for the first year (when there is an agreed audit term) or the second year, and the low-risk suppliers are planned for the third year of a three-year plan. An additional criterion called regulatory priority

exists and is not associated with quality but relates to regulatory requirements. If a supplier audit is necessary according to this criterion, then it is planned in the first year of the three-year plan, regardless of supplier's status in the risk analysis. The risk analysis and the audit plan are regularly updated, by monitoring the quality of the supplied materials (via the software program AlkaSAP) or the provided service, supplier's regulatory status (certification by regulatory agencies) and the everyday communication. This means that a low-risk supplier may quickly become a medium or high risk and its audit to be prioritized or vice versa. The audits are conducted by trained and experienced personnel from Alkaloid AD. In addition, an independent specialized agency could be hired to conduct a so called "Third Party Audit" of the suppliers, on behalf of Alkaloid AD.

RESULTS

During 2009, 2010 and the first three months of 2011, 15 audits of API manufacturers were conducted which of 12 audits were conducted by trained personnel from Alkaloid AD, and 3 audits were conducted by third party auditors on behalf of Alkaloid AD. The audits covered a total of 26 API. In early 2011 one audit of an excipients manufacturer was conducted. One audit of a contract laboratory and two audits of contract manufacturers were also conducted. During the same period, two producers of primary packaging materials and four suppliers of secondary packaging materials were audited. The most common reason for delayed implementation of the audit plan check is the overload of the suppliers (especially of the API manufacturers) with audits from their customers, so the audits are scheduled for the first possible date provided by the suppliers.

CONCLUSIONS

Risk analysis upon which the audit plan is based, represents an excellent system for complete tracking of supplier's status, and allows Alkaloid AD to prioritize the audits of the suppliers which are either high-risk or a regulatory priority.

The audit of starting material suppliers represents a tool for evaluation of their quality system and manufacturing facilities, and might ultimately result in reduced testing [8]. Alkaloid AD has a clear policy that treats its suppliers as partners. Through the system of regular audits, daily communication and testing of the quality of starting materials, Alkaloid AD is confident in the quality of the starting materials, while meeting the regulatory requirements that apply to the suppliers of starting materials.

REFERENCES

- [1] Procedure for Supplier Assessment A 2 7.4. 02 ver. 2
- [2] McKilligan R G., MHRA GMP Inspector: API Focussed MHRA Inspections at Dosage Form Manufacturers, 2010
- [3] Directive 2001/83/EC/ 46f of the European parliament and of the council from 06.11.2001
- [4] EudraLex, Volume 4 Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines, Part I
- [5] EudraLex, Volume 4 Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines, Part II, 5.40
- [6] EU GMP Annex 8 - Sampling of Starting and Packaging Materials
- [7] ICH Q9 Quality Risk Management adopted by the European Medicines Agency on 31.01.2011
- [8] EudraLex, Volume 4 Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines, Part I, Draft version Chapter 5

АНАЛИЗА НА РИЗИК КАКО ЕФИКАСНА АЛАТКА ЗА ПРОВЕРКА НА ИСПОРАЧАТЕЛИ НА ВЛЕЗНИ МАТЕРИЈАЛИ

Борче Стаматоски, Мирослав Поповски,
Мирослава Илиевска, Маја Велиновска-
Чадиноска, Катерина Алексијевска Белдедовска

*АЛКАЛОИД АД - Скопје, Фармацеутска, Хемиска и Козметичка Компа-
нија, Александар Македонски 12, 1000 Скопје, Република Македонија*

ВОВЕД

Испорачатели се правни лица (претпријатие или лице) кои испорачуваат или произведуваат сировини и паковни материјали или извршуваат услуги за компанијата нарачател. Квалифициран испорачател претставува испорачател кој исполнува високи стандарди за квалитет, и тоа врз основа на претходна оценка, преглед на ретроспективни податоци, сертификат од инспекција извршена од регулаторен орган и проверка на производните погони и системот за квалитет и животна средина, како и исполнување на барањата од поставените критериуми. Квалификацијата на испорачателите се врши за да се утврди нивната способност да испорачаат материјали во согласност со законските прописи за соодветните материјали, како и утврдените спецификации за квалитет [1]. Притоа регулаторните барања за Активните фармацевтски ingredienti се најстроги и затоа од производителот на лекови за хумана употреба се очекува да врши евалуација на производителите на активни фармацевтски ingredienti преку редовни проверки на нивните производни капацитети [2]. Според Директивата на Европскиот парламент и совет [3] производителот на лекови за хумана употреба мора да употребува активни супстанции (во некои случаи ова се однесува и за ексципиенти) кои се произведени според барањата на Добрата производна пракса [4]. На снабдувањето, ракувањето и контролата на примарната и секундарната амбалажа треба да се посвети слично внимание како тоа за Активните супстанции и ексципиентите [5]. Корисникот на влезните материјали треба да ја земе во предвид доверливоста на испорачателот, минатиот квалитет на материјалот или услугата што ја добавуваат и треба да врши оценка на системот за квалитет и условите за производство [6].

ЦЕЛИ НА ТРУДОТ

Имајќи ги предвид регулаторните барања и очекувања, Алкалоид АД воспостави систем за проценка на ризик како алатка за едноставно и ефикасно планирање на проверките на своите испорачатели, било да се работи за нов или веќе постоечки испорачател а притоа следејќи ги препораките дадени во Водичот за управување со ризик [7].

Главна цел на овој труд е да се прикаже начинот на планирање на проверките на големиот број испорачатели на Алкалоид АД и да се нагласи бенефитот за компанијата од ваквите проверки.

МЕТОДИ

Согласно препораките дадени во Водичот за Управување со ризик [7] и поставените критериуми во ризик анализата на испорачателите направен е тригодишен план (2009, 2010 и 2011) за проверка. Поставени се пет критериуми, кои се однесуваат на квалитетот на материјалот/услугата која испорачателот ја добавува, претходните

поминати регулаторни инспекции, како и претходна проверка од страна на Алкалоид АД. Според нив, испорачателите се класифицирани во три групи: ниско, средно и високо ризични. За високо ризичните испорачатели се планира проверка во првата година од тригодишниот план, средно ризичните се планираат за првата година (доколку има договорен термин) или втората година, а ниско ризичните добавувачи се планираат за третата година од тригодишниот план. Додатен критериум кој не е поврзан со квалитетот, а се однесува на регулаторни барања е т.н. регулаторен приоритет. Доколку е потребна проверка на испорачателот според овој критериум, тогаш за истиот проверка се планира во првата година од тригодишниот план независно каков статус има од ризик анализата. Ризик анализата и планот за проверка се ажурираат редовно, следејќи го квалитетот на материјалот (преку софтверот АлкаСАП) или услугата која испорачателите ја добавуваат, нивниот регулаторен статус (сертификати од регулаторни агенции) и секојдневната комуникација. Ова значи дека ниско ризичен испорачател може за кратко време да стане средно или високо ризичен и неговата проверка да добие приоритет и обратно. Проверките ги извршуваат обучени и искусни лица од Алкалоид АД. За проверка на испорачателите може да се ангажира и некоја независна агенција за проверка од трета страна.

РЕЗУЛТАТИ

Во текот на 2009, 2010 и првите три месеци од 2011 година извршена е проверка на 15 производители на активни фармацевтски ingredienti од кои кај 12 проверките се извршени од страна на обучени лица од Алкалоид АД, а кај 3 проверката е извршена од трета страна. Во проверките опфатени се вкупно 26 активни фармацевтски ingredienti. Во почетокот на 2011 направена е проверка на еден производител на ексципиенти. Извршена е и проверка на една договорна лабораторија и две договорни производства. Во текот на наведениот период проверени се два произволителя на примарни паковни материјали и четири испорачатели на секундарна амбалажа. Најчеста причина за ненавремено исполнување на планот за проверка е презафатеноста на испорачателите (особено на активни фармацевтски ingredienti) со проверки од сите свои купувачи, па некогаш проверката иако планирана во конкретен термин се закажува за првиот можен термин.

ЗАКЛУЧОЦИ

Ризик анализата од која произлегува планот за проверка претставува одличен систем за комплетно следење на статусот на испорачателите со што многу лесно се издвојуваат и приоритизираат проверките на високо ризичните и регулаторно потребните испорачатели.

Проверката на испорачателите на влезни материјали претставува алатка за евалуација на системот за квалитет и производните капацитети со кои тие располагаат и која на крај може да резултира со редуцирано тестирање [8]. Алкалоид АД има јасна политика со која испорачателите ги третира како партнери. Преку системот на редовни проверки, секојдневна комуникација и проверка на квалитетот на влезните материјали Алкалоид АД е сигурен во квалитетот на влезните материјали, истовремено исполнувајќи ги регулаторните барања кои се однесуваат на испорачателите на влезни материјали.

ЛИТЕРАТУРА

1. Процедура за Оценка на испорачатели A 2 7.4. 02 ver. 2
2. McKilligan R G., MHRA GMP Inspector: API Focussed MHRA Inspections at Dosage Form Manufacturers, 2010
3. Directive 2001/83/EC/ 46f of the European parliament and of the council from 06.11.2001

4. EudraLex, Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines, Part I
5. EudraLex, Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines, Part II, 5.40
6. EU GMP Annex 8- Sampling of starting and packaging materials
7. ICH Q9 Quality risk management adopted by the European medicines agency on 31.01.2011
8. EudraLex, Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines, Part I, Draft version Chapter 5

STERILE MULTIDOSE LIDOCAINE 2% ANESTHETIC GEL – GALENIC PREPARATION AS A REPLACEMENT OF THE COMMERCIAL PRODUCT

T. Dimitrovska Manojlovič1, M. Pavlovska2.

¹Clinical hospital-Bitola, Hospital pharmacy-pharmacoinformative centre, Bitola, R. Macedonia

²Clinical hospital-Bitola, Hospital pharmacy, Bitola, R. Macedonia

INTRODUCTION

Facing the problem of deficiency of a commercial pharmaceutical dosage form of Lidocaine 2% anesthetic gel from the pharmaceutical industry in our country we have decided to prepare it as a galenic preparation and research its microbiological and content integrity. In fact, in the moment of our decision there was a deficiency of registered commercial pharmaceutical dosage form of that product that is extensively applied in the most of the hospital wards. So, providing the hospital wards with this preparation was our initiative that obliged us to solve this problem.

OBJECTIVES

To supply hospital wards with lidocaine 2% anesthetic gel with compounded galenic preparation - Sterile multidose 2% Lidocaine gel as a replacement of the industrial commercial preparation.

METHODS

After extensive research of the tertiary and primary literature through various and *on line* compendium formulations we developed our own composition according to our ingredients and hospital wards needs. Ingredients used for this preparation were: powder Lidocaine HCl (Sigma-Aldrich, USA, USP), Carboxymethyl-cellulose Na, high viscosity (Sigma-Aldrich, USA, USP), Aqua sterillisata 3rd Ed, PhP, 1998 (our hospital Department for infusion solutions production.). We prepared the gel in the galenic laboratory in the pharmacy. Then we sterilised extemporaneously prepared gel according Ph.Eu. 3rd Ed. PhP, 1998, with autoclave sterilisation process in the Department for infusion solutions production in our hospital) and in the same department we packed it according Ph.Eu. 3rd Ed, with aseptic procedure in the 10 ml sterile syringes (BD and Co. Discardit™, NJ, USA). Tests of the content of lidocaine HCl in this preparation were performed in the Analytical laboratory at the Department for infusion solutions production in our hospital. Sterility tests were performed in the Microbiological department of Centre for public health, Bitola.

RESULTS

Content analysis of lidocaine HCl confirmed that the preparation met the requirements (average content = 19.90 mg lidocaine HCl/1 g gel). Average pH = 6.7 and meets the requirements too. Sterility control tests also confirmed the sterility or consent of the preparation with

the pharmacopoeial requirements.

DISCUSSION AND CONCLUSION

We formulated our own formulation and producing process for sterile multidose anesthetic Lidocaine 2% gel. Primarily we prepared a small amount i.e. small series of the preparation, on which all tests we performed respectively. On the base of results we produced large quantity and packed it as a multidose preparation. The whole procedure of preparing of this preparation was: 1. developing suitable formulation; 2. compounding/producing of the gel; 3. sterilising of the gel with autoclaving; 4. packing; 5. content test of the active substance; 6. pH determination; 7. sterility control test.

Taking all these into consideration, we prepared sterile multidose lidocaine 2% anesthetic gel in the hospital pharmacy of the Clinical hospital in Bitola and we surpass the problem of deficiency in our country of the commercial pharmaceutical dosage form for supplying of the hospital wards.

LITERATURE

1. Martindale The complete drug reference, 34th Ed. PhP, London, Chicago, 2005
2. Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Edition. Mack Publishing Co., Easton, PA, 1985
3. www. Compounding Today. com
4. USP 31, The United States Pharmacopoeial Convention 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852, may 2008
5. Ph. Eu. 3rd Ed, PhP, 1998
6. Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems by Howard C. Ansel, Lippincott Williams & Wilkins, oct. 1999
7. Merck Index, 12th Edition, 1996 for solubility information
8. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4th edition, 2003
9. <http://pharmlabs.unc.edu>, then select Suspensions and Gels

СТЕРИЛЕН ПОВЕЌЕДОЗЕН ЛИДОКАИН 2% ГЕЛ – ГАЛЕНСКИ ПРЕПАРАТ КАКО ЗАМЕНА НА ГОТОВ ЛЕК

T. Димитровска Манојловиќ1, М. Павловска2.

¹Клиничка болница – Битола, Болничка аптека, Фармакоинформативен центар, Битола, Р. Македонија

²Клиничка болница – Битола, Болничка аптека, Битола, Р. Македонија

ВОВЕД

Соочувајќи се со проблемот на недостаток на готова фармацевтска дозирана форма – Лидокаин 2% анестетичен гел од фармацевтската индустрија во нашата земја, ние одлучивме да припремиме галенски препарат и да ја испитаме неговата микробиолошка стабилност и соодветност на содржината на активната компонента. Во моментот на нашата одлука постоеше дефицит на регистрирана готова фармацевтска дозирана форма на овој препарат, кој нашироко се употребува во болничките одделенија. Затоа, снабдувањето на болничките одделенија со овој препарат беше наша иницијатива што не обврза да го решиме проблемот.

Цел на трудот: Снабдување на болничките одделенија со Лидокаин

2% анестетичен гел со галенски припремен препарат - Стерилен повеќедозен лидокаин 2% гел како замена за фабрички готов лек.

МЕТОДИ

После широко пребарување на терциерна и примарна литература низ различни формулации и "on line" компендиуми, ние развивме наша сопствена формулација водејќи се од нашите расположливи состојки и потребите на болничките одделенија. Состојките употребени за овој препарат се: прашок Lidocaine HCl (Sigma-Aldrich, USA, USP), прашок Carboxymethyl-cellulose Na, high viscosity (Sigma-Aldrich, USA, USP), Aqua sterilisata, Ph.Eur. 3rd Ed, PhP, 1998 (производ на Одделението за инфузиони раствори во нашата болница). Ние го припревивме гелот во галенската лабораторија во болничката аптека. Потоа го стерилизиравме така припремениот гел во согласност со барањата на Ph.Eu. 3rd Ed, PhP, 1998, со терминална стерилизација - автоклавирање во Одделението за инфузиони раствори во нашата болница. Во истото одделение гелот го спакувавме во согласност со барањата на Ph.Eur. 3rd Ed, PhP, 1998, со асептична постапка во стерилни шприцеви од 10 мл. (BD and Co. Discardit™, NJ, USA). Тестовите на содржината на лидокаин хидрохлорид ги изведовме во одделот за контрола на лекови при Одделението за инфузиони раствори во нашата болница, а тестовите на стерилност беа изведени во микробиолошката лабораторија на Центарот за јавно здравје во Битола.

РЕЗУЛТАТИ

Анализата на содржината на лидокаин хидрохлорид потврди дека препаратот ги задоволува барањата (средна вредност е 19.90 мг. Лидокаин хидрохлорид на 1 г. гел). Средна pH вредност е 6.7 и исто така ги задоволува барањата. Тестовите за контрола на стерилноста исто така ја потврдија стерилноста на препаратот, соодветно на фармакопејските барања.

ДИСКУСИЈА И ЗАКЛУЧОЦИ

Формулиравме наша сопствена формулација и производна постапка за стерилен повеќедозен анестетичен Лидокин 2% гел. Најпрво припревивме мала количина, односно мали серии на препаратот, на кои соодветно ги направивме сите тестови. Врз основа на добиените резултати направивме голема количина и ја спакувавме како повеќедозен препарат. Целосната постапка на припремање на овој препарат опфаќа: 1. развивање на соодветна формулација; 2. изработка на гелот; 3. терминална стерилизација - автоклавирање; 4. пакување; 5. испитување на содржина на активната компонента; 6. одредување на pH вредност; 7. тест на стерилност. Земајќи го сето ова во предвид, ние припревивме стерилен повеќедозен лидокаин 2% анестетичен гел во болничката аптека на Клиничка болница - Битола и го решивме проблемот на дефицит на готов фабрички лек за снабдување на одделенијата во нашата болница.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Martindale The complete drug reference, 34th Ed. PhP, London, Chicago, 2005
2. Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Edition. Mack Publishing Co., Easton, PA, 1985
3. www. Compounding Today. com
4. USP 31, The United States Pharmacopeial Convention 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852, may 2008
5. Ph. Eu. 3rd Ed, PhP, 1998
6. Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems by Howard C. Ansel, Lippincott Williams & Wilkins, oct. 1999
7. Merck Index, 12th Edition, 1996 for solubility information

8. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4th edition, 2003
9. <http://pharmlabs.unc.edu>, then select Suspensions and Gels

GMP IN THE PRODUCTION OF INFUNDIBILIA

M. Pavlovska

Klinicka bolnica Bitola, Bolnicka apteka Bitola, R. Makedonija

INTRODUCTION

The validation of the process of sterile production can not be done before the previous implementation of Qualification of procedures, Qualification of Equipment, Facility, Systems, and Process validation which are different segments of the process of sterile production where we have terminal sterilization.

PURPOSE

To demonstrate the validation of the process of sterile production of infundibilia of Natrii chloride infundibile cum glucose 5%,0,9% (2:1) through the research of three consecutive pilot series.

METHODS

The validation of the process of sterile production of Natrii chloride infundibile cum glucose 5%,0,9% (2:1) covers the stages of the overall process of production. Stages in the production are: 1.Weight 2.Barboting 3. Dissolve the active substance 4. Dissolve of component for the adjustment of pH-value of the solution 5. Filling up to final volume 6.Membrane filtration 7.Dosage 8.Streilization 9.Visual control 10.Packing In order to analyze the parameters in the physical-chemical and microbiological research we use the following methods : 1.pH values 2. Conductivity 3. Bacterial endotoxines 4.Content of Natrium chloride 5. Content of glucose 6.The looks of the solution 7.Solutio bio-burden 8.Mechanical impurities 9.Sterility

RESULTS

The critical parameters in the process of terminal sterilization are the temperature and the time from which the sterility of the given product depends.

- » results of the physical analyses of put termoelements in the autoclave-penetration of temperature
- » results of the physical/microbiological analysis-microbiological validation – Bi
- » monitoring of parameters for every sterilizations cycle (time, temperature, pressure)
- » results of the microbiological analyses of the samples of the solution of Natrii chloride infundibile cum glucose taken before the filtration equipment
- » results of the physical and chemical analyses of the samples of solution of Natrii chloride infundibile cum glucose taken before the filtration equipment
- » results of the physical and chemical analyses of the samples of the solution of Natrii chloride infundibile cum glucose taken during and after the continuous process of production after filtration
- » results of the physical/chemical research of glass containers filled with solution of Natrii chloride infundibile cum glucose aken after autoclaving

- » results of the microbiological analysis of the samples of the glass containers filled with solution taken after autoclaving
- » results of the analyses of content of active substance in the final solution

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

After the three documented series were made, the process for production of Natrii chloride infundibile cum glucose is considered to be validated. The validation of the process of sterile production in aseptic working conditions, confirms, the capacity of the process to yield a product of an adequate quantitative, qualitative and micro-biological quality.

REFERENCES

1. Drug, device and manufacturing, Carol Desain
2. Pharmaceutical Dosage forms (Parenteral Medications) Herbert A. Lieberman Vol 2
3. Pharmaceutical Process validation, Ira R. Berry, Robert A. Nash, Karl L. Hofmann
4. WHO good manufacturing practices: specific pharmaceutical products (Sterile pharmaceutical product)
5. Guidance for Industry – Sterile Drug products Produced by Aseptic processing – Current Good Manufacturing Practice, 2004
<http://www.fda.gov/cder/guidance/5882fnl.pdf>

GMP ПРИ ПРОИЗВОДСТВО НА ИНФУНДИБИЛИЈА

М. Павловска

Клиничка болница Битола, Болничка аптека Битола, Р.Македонија

ВОВЕД

Валидацијата на процесот на стерилното производство не може да се спроведе пред да бидат претходно спроведени постапките на Квалификација на Опремата, Просторот, Системите и Валидација на процесите кои преставуваат одделни сегменти од процесот на стерилно производство, каде имаме терминална стерилизација.

ЦЕЛ НА ТРУДОТ

Да се прикаже валидација на процес на стерилно производство на инфундибилија Natrii chloride infundibile cum glucose 5%, 0,9% (2:1) преку испитување на три консеквентни пилот серии.

МЕТОДИ

Валидацијата на процесот на стерилно производство на Natrii chloride infundibile cum glucose 5%, 0,9% (2:1) ги опфаќа фазите на вкупниот процес на производство. Фази во тек на производниот процес: 1. Мерење 2. Барботирање 3. Растварање на активна компонента 4. Растварање на компонента за подесување на рН 5. Дополнување до финален волумен 6. Мембранска филтрација 7. Дозирање 8. Стерилизација 9. Визуелна контрола 10. Пакување. За анализа на параметрите во тек на физикохемиското и микробиолошкото испитување се користат следните методи: 1. рН вредност 2. Кондуктивност 3. Бактериски ендотоксини 4. Содржина на Natrium chloride 5. Содржина на глукоза 6. Изглед на растворот 7. Биобурден на растворот 8. Механички онечистувања 9. Стерилност

РЕЗУЛТАТИ

Критични параметри кај процесот на терминална стерилизација се температурата и времето од кои зависи постигнувањето на бараната стерилност на дадениот производ.

- » резултати од физичко испитување на поставени термоелементи во автоклав – пенетрација на температура
- » резултати од физичко/микробиолошки испитувања – микробиолошка валидација – Ви
- » следење на параметрите за секој стерилизациски циклус (време, температура, притисок)
- » резултати од микробиолошко испитување на примероци на раствор на Natrii chloride infundibile cum glucoso земени пред опремата за филтрирање
- » резултати од физикохемиско испитување на примероците на растворот на Natrii chloride infundibile cum glucoso земени пред опремата за филтрирање
- » резултати од физикохемиско испитување на примероците на раствор на Natrii chloride infundibile cum glucoso земени во тек и на континуиран процес на производство после филтрирање
- » резултати од физикохемиско испитување на примероците на стаклени контејнери исполнети со раствор на Natrii chloride infundibile cum glucoso земени после автоклавирање
- » резултати од микробиолошко испитување на примероците на стаклени контејнери исполнети со раствор на Natrium chloride infundibile cum glucoso земени после автоклавирање
- » резултати од испитување на содржината на активната компонента во вкупен раствор

ЗАКЛУЧОЦИ И ДИСКУСИЈА

После изведени три документиранни серии, процесот за производство на Natrii chloride infundibile cum glucose 5%, 0,9% (2:1) се смета дека е валидиран. Валидацијата на процесот на стерилно производство во асептични услови на работа, ја потврдува способноста на процесот да произведува производ со соодветен квалитативен, квантитативен и микробиолошки квалитет.

ЛИТЕРАТУРА

1. Drug, device and manufacturing, Carol Desain
2. Pharmaceutical Dosage forms (Parenteral Medications) Herbert A. Lieberman Vol 2
3. Pharmaceutical Process validation, Ira R. Berry, Robert A. Nash, Karl L. Hofmann
4. WHO good manufacturing practices: specific pharmaceutical products (Sterile pharmaceutical product)
5. Guidance for Industry – Sterile Drug products Produced by Aseptic processing – Current Good Manufacturing Practice, 2004
<http://www.fda.gov/cder/guidance/5882fnl.pdf>

DOCUMENT MANAGEMENT SYSTEM AS PART OF COMPUTERIZED SYSTEMS IN ALKALOID AD

Verce Jovanovska Jankovska, Nada Popstefanova,
Elizabeta Karadzinska, Darko Atanasoski,
Miroslava Ilievska

Alkaloid AD Skopje, Blvd. Aleksandar Makedonski 12, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

INTRODUCTION

There are different forms of computerized systems used as part of a GMP regulated activities. A computerized system is a set of software and hardware components which together fulfill certain functionalities. The application should be validated, IT infrastructure should be qualified. Where a computerized system replaces a manual operation, there should be no resultant decrease in product quality, process control or quality assurance. There should be no increase in the overall risk of the process¹.

Document management System is extremely configurable web application for the purposes of managing with document. It is a system that enables completely and secure control of documents during their creation, reviewing, approving, publishing, maintaining reusing and archiving. Well managed documentation is one of the most important attributes of a successful organization

Risk management should be applied throughout the lifecycle of the computerized system taking into account patient safety, data integrity and product quality. As part of a risk management system, decisions on the extent of validation and data integrity controls should be based on a justified and documented risk assessment of the computerised system.

PERSONNEL

Close cooperation between all relevant personnel with appropriate qualification, level of access and defined responsibilities¹

SCOPE

The purpose of this software enables import of documents, classification of scanned documents, publishing of the documents (word, PDF rendition), controlled printing, linking of documents (related documents, virtual documents)

Controlled distribution including confirmation of requirement (distribution list, read and understood confirmation), production of document change request

METHODS

Definition of: user roles, lifecycle, workflows, audit trail records.

User permissions and available attributes may depend on user role, lifecycle state, workflow activity. Users are assigned to roles and according to their role have different permissions to work with a document

Definition of lifecycles and workflows

Splitting document lifecycle in lifecycle states helps us to precisely define and model business processes

For each lifecycle state we should define: automatic actions that will be performed on the document, location (path) of the document, sequence of activities and performers of those activities (workflow), information that will be stored in audit trail record

Each business policy defines a series of states (such as "draft", "review" or "approved") through which a document progresses.

Besides the possibility of creating, reviewing, approving with appropriate roles of the author, reviewer, approver there is a possibility of document rejection, notes, archiving, suspending either way traceability, as well as versions and current state of the document is possible together with audit trail. Signing is performed in the system electronically.

CONCLUSION:

Document Management Systems enables creation, reviewing, approving, archiving the document electronically, with full traceability and audit trail performance of who, when, where, why started, reviewed and finish the document.

REFERENCES

1. Eudralex - The rules governing medicinal products in the European union - Volume 4 EU Guidelines to Good Manufacturing Practice - Annex 11: Computerized systems

СИСТЕМ ЗА УПРАВУВАЊЕ СО ДОКУМЕНТИ КАКО ДЕЛ ОД КОМПЈУТЕРИЗИРАНИ СИСТЕМИ ВО АЛКАЛОИД АД

Верче Јовановска Јанковска, Нада Попстепанова,
Елизабета Караџинска, Дарко Атанасоски,
Мирослава Илиевска.

Алкалоид АД Скопје, Бул. Александар Македонски 12, 1000 Скопје, Република Македонија

ВОВЕД

Како дел од ДПП регулираните активности се употребуваат различни форми на компјутеризирани системи. Компјутеризиран систем претставува сет на компоненти од хардвер и софтвер кои заедно исполнуваат одредени функционалности. Потребно е апликацијата да е валидирана и ИТ инфраструктурата квалификувана. Замената на мануелна операција со компјутеризиран систем не треба да резултира со намалување на квалитетот на производот, процесната контрола или обезбедувањето квалитет. Не треба да има пораст во вкупниот ризик на процесот¹.

Системот за Управување со Документи претставува високо конфигурабилна мрежна апликација со цел за управување со документот. Тоа е систем кој овозможува целосна и безбедна контрола на документите за време на нивното креирање, преглед, одобрување, објавување, одржување на повторна употреба и архивирање. Добро управувана документација е еден од најважните атрибути за успешна организација.

Управување со ризик треба да се аплицира низ целиот животен циклус на компјутеризираниот систем земајќи ги во предвид безбедноста на пациентот, интегритетот на податоците и квалитетот на производот. Како дел од системот за управување со ризик, одлуките за степенот на валидација и контрола на интегритетот на податоците треба да се базираат на оправдана и документирана проценка на ризикот на компјутеризираниот систем.

ПЕРСОНАЛ

Блиска соработка меѓу вкупниот релевантен персонал со соодветна квалификација, ниво на пристап и дефинирани одговорности¹.

ПОДРАЧЈЕ

Целта на овој софтвер е овозможување на внесување документи, класификација на скенирани документи, објавување на документите (word, PDF облик), контролирано печатење, поврзување на документите (сродни документи, виртуелни документи).

Контролирана дистрибуција вклучувајќи потврда за утврдена потреба (дистрибуциона листа, потврда за прочитано - разбрано), креирање на барање за промена на документ.

МЕТОДИ

Дефиниција на: улоги на корисници, животен циклус, работни текови, записи за следливост на активностите.

Дозволите за корисникот и достапните атрибути зависат од улогата на корисникот, стадиумот на животниот циклус, активната на тековниот процес. Корисниците имаат доделени улоги и според својата улога имаат различни дозволи за работа со документот.

Дефиниција на животни циклуси и процесни текови

Поделбата на животниот циклус на документот на стадиуми помага во прецизно дефинирање и моделирање на бизнис процесите.

За секој стадиум на животниот циклус потребно е да се дефинира: автоматските активности кои ќе се изведуваат на документот, локацијата (патот) на документот, последователност на активностите и изведувачите на овие активности (процесен тек), информација која ќе биде складирана во записите за следливост на активностите.

Секоја бизнис политика дефинира серија на стадиуми (како „нацрт“, „преглед“ или „одобрен“) преку кои се утврдува прогресот на документот.

Покрај можноста за креирање, преглед, одобрување, со соодветни улоги на авторот, прегледувачот, одобрувачот, постои можност за одбивање на документот, забелешки, архивирање, следливост на повлекување на документот, како и утврдување на верзиите и моменталниот стадиум на документот е овозможено заедно со следливоста на активностите. Потпишувањето во системот се изведува електронски.

ЗАКЛУЧОК:

Системот за Управување со Документи овозможува електронско креирање, преглед, одобрување, архивирање на документот со целосна следливост за активностите кој, кога, каде, зошто, го започнал, прегледал и завршил документот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Eudralex - The rules governing medicinal products in the European union - Volume 4 EU Guidelines to Good Manufacturing Practice - Annex 11: Computerized systems

RISK MANAGEMENT FOR SOLUTION FOR HAEMODIALYSIS AMINAL 100B

Nada Popstefanova, Svetlana Trajkoska Dabevska, Ornela Kuzmanovska, Sonja Sterjevaska

ALKALOID AD Skopje

INTRODUCTION

Risk management according ISO 14971:2007 for is very important tool for medical device liability. The goal of responsible manufacturer is to reduce product risk and identify the level of remaining risks, which are tied to user's (clinician and patient) safety.

GOAL

The primary purpose of designed Product Risk Management File for concentrated solution for haemodialysis Amino 100B is to evaluate a product's risk for acceptance, reduction and/or mitigation. This document has many uses – it is important part of CE-marking Technical File / EU's Medical Device Directive Design Dossier and prominent part of all risk-based activities as CAPA investigations, product and management reviews etc. This controlled document is subjected to periodic reviews, linked to CAPA/ Design / Change Control system and also to Management Reviews / Internal Audit.

METHODS

The Risk Management File documents product – Amino 100B during whole lifecycle. The file begins with top-level document Risk Management Plan which defines how risk management for Amino 100B is implemented, by whom and when, as well as lifecycle considerations and interfaces. The risk management process which includes hazards/risk analysis, purpose, risk estimation and classification is reflected in next document. The risk control/ mitigation including options/ actions and risk/benefit analysis is next document. Methodology used in risk assessment activities for Amino 100B is FMEA (Failure Mode, Effects Analysis). The Risk Management Report, which covers key issues and gives conclusions, is summary of all data recorded in Risk Management File for Amino 100B.

RESULTS

Hazards / risks are evaluated as physical, chemical, biological, environmental and risks in use. According the risk action evaluation and corrective actions: for Amino 100B no risk is classified with high priority, there are only 4 risks with medium priority with risk priority number (RPN ≥ 4) and 22 risks with RPN < 4 which means - low priority. Risks appearance, effect and detection is monitored during all processes for each batch of product. In the case of each unconformity, atypical or process result out of limits, a corrective action or deviation is initiated. These corrective actions contribute to the reduction or removal of specified risk the consequences of the product and its application

Concerning risk as microbiological contamination of the dialysis liquid or inadequate care of the vascular access points in medical centers, the control is provided in medical institutions by detailed instructions, training and control.

CONCLUSION

The risk management report ensures the acceptable level of risk control, the status of defined risks and effectiveness of actions taken

for Alkaloid's medical device – concentrated solution for haemodialysis Aminimal 100B.

REFERENCES

- ISO 14971:2007- Medical devices -Application of risk management to medical devices
- EC Directive 93/42/EEC of June 14,1993 and amended M5
- ICH Q9

УПРАВУВАЊЕ СО РИЗИК ЗА РАСТВОР ЗА ХЕМОДИЈАЛИЗА AMINAL 100B

Нада Попстефанова, Светлана Дабевска Трајкоска, Орнела Кузмановска, Соња Стерјевска
ALKALOID AD Skopje

ВОВЕД

Управување со ризик соодветно стандардот ISO 14971:2007 е многу важна алатка за утврдување на одговорноста при производство на медицински помагала. Целта е да се редуцираат ризиците при производство и да се утврди нивото на прифатливост на преостанатите ризици поврзани со безбедната употреба на производот (лекар и пациент)

ЦЕЛ

Примарна намена на креирањето на документот за Управување со ризик за производот раствор за хемодијализа Aminimal 100B, е да се оцени прифатливоста или намалувањето/редукција на ризикот при производство и примена на овој производ. Овој контролиран документ има повеќе намени-тој е составен дел на Техничкото досие за CE знакот/EU DIR 93/42/EEC, важен елемент на САРА активности,дел е од прегледите на раководство како и прегледите за производ,дел од системот на Контрола на промени, интерни проверки и.т.н

МЕТОД

Се започнува со План за Управување на ризик, како документ од највисоко ниво во кој се дефинира кој, кога и како ќе го спроведува управувањето со ризикот во тек на целиот животен циклус за производот. Процесот на управување со ризикот кој ја вклучува контролата на ризикот, оценката, класификацијата на ризик, опции за ублажување и активности за редуцирање на ризикот продолжува во следната фаза. FMEA анализа (Failure Mode, Effects Analysis) е методата што се користи за оценка на ризикот. Извештајот што произлегува од примената на оваа метода, со анализа на клучните прашања и крајните заклучоци, преставува резиме на сите активности поврзани со Управувањето на ризик.

РЕЗУЛТАТИ

Влијанијата од појавата на одреден ризик врз производот може да се класифицираат како: физички, хемиски, биолошки, ризици поради влијание на околината и ризици при употреба на производот. Со примена на RPN методата на производот Aminimal 100B и преземање корективни акции за утврдените ризици, крајниот резултат од анализата на ризик е дека не постои ризик од највисок приоритет, детектирани се 4 ризици со среден приоритет (RPN \geq 4) и 22 ризици со RPN < 4 што значи дека се со низок приоритет. Појавата на ризик,влијанието врз процесот и класификација на истиот, се врши за секоја серија производ. Во случај на било какво

отстапување или вредности надвор од специфицираните лимити, се иницира корективна активност или се креира девијација. Со овие корективни дејства се допринесува за намалување или отстранување на последиците од утврдениот ризик врз производот и неговата примена.

За да се избегне ризикот од микробиолошко загадување на растворот за хемодијализа во медицинските установи, поради негова несоодветна примена и ракување, се обезбедуваат упатства за употреба и обука за медицинскиот персонал.

ЗАКЛУЧОК

Извештајот за управување со ризик обезбедува прифатливо ниво и дефиниран статус за ризик како и ефективност на преземени корективни дејства за медицинското помагало-концентриран раствор за хемодијализа Aminimal 100B .

РЕФЕРЕНЦИ

- ISO 14971:2007- Medical devices -Application of risk management to medical devices
- EC Directive 93/42/EEC of June 14,1993 and amended M5
- ICH Q9

ANALYSIS OF LIPOSOMES WITH RESVERATROL AND VITAMIN C AND E

Atanacković M¹, Cvejić J¹, Bursać M¹,
Lj. Gojković-Bukarica², H. Heinle³

¹Department of pharmacy, Faculty of medicine, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Serbia,

²Department of Pharmacology and Toxicology and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia,

³Institute of Physiology, University of Tubingen, D-72076 Tubingen, Germany

Trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) is a naturally occurring phytoalexin isolated for the first time from the root of *Veratrum grandiflorum* in 1940. Since then, it has been isolated and identified in over 70 different plant species. Resveratrol is used in traditional medicine for treatment of different bacterial and fungal infections, inflammations, dermatitis, heart, liver and blood vessels diseases (1). Numerous publications suggest that this polyphenol possesses variety of biological properties which include inhibition of lipid peroxidation, prostaglandine synthesis and trombocyte aggregation, free radical quenching, vasodilatation, antineoplastic and estrogenic activity (2-5). Still, resveratrols' physical properties are limiting factor for its application. It has low water solubility (<0.001 mol/l) and converts to less active cis-form when irradiated with UV light (6). Most of the experiments use resveratrol in its free form, dissolved in organic solvents, which are inappropriate for pharmaceutical application. Some suggested ways for improvement of resveratrol low solubility include micellar and liposomal solubilization (6-8). Liposomes are optimal carriers for the entrapment and cellular delivery of drugs because they can incorporate a lipophilic drug within the membrane bilayers and protect it from light and other degradative processes.

The aim of the study was to characterize liposomes prepared with resveratrol and vitamin C and vitamin E and to evaluate their antioxidant potential.

Liposomes containing 200 mM of resveratrol (RL) and mixture of 200 mM of resveratrol with the same amount of vitamin C (RLC) or E (RLE) were prepared using thin lipid film hydration method. Lipid phase comprised of Phospholipon 90H, cholesterol and di-cetyl phosphate. Control samples (pure liposomes) were produced without addition of resveratrol or vitamins. Preparations were subjected to successive sonication and filtration and particle size, polydispersity index and zeta potential was determined. Antioxidative properties of preparations were evaluated by the suppression of luminol-enhanced chemiluminescence from spontaneous thermic decomposition of 2-2'aminoozopropane dihydro-chloride (AAPH). Antioxidative activity was determined by graphical analysis and quantified using calibration curve prepared with pure resveratrol or resveratrol and vitamin C or E. Results showed that for liposomal preparations with pure resveratrol and resveratrol in combination with vitamin E, successive sonication and filtration lead to decrease of particle size and polydispersity index. More specifically, particle size of liposomes with resveratrol decreased from 4647 to 119.7 nm while liposomes with vitamin E had initial size 647.5 nm and after sonication it was 177.5 nm. Filtration additionally decreased particle size, which was at the end 119.7 and 177.5 nm for RL and RLE, respectively. On the other hand, applied procedure did not have the same effect on liposomes with resveratrol and vitamin C. Particles with size above 1000 nm were still present in preparation, which indicates system instability and occurrence of particle aggregation. Similar results concerning liposomes prepared with vitamin C were not observed in literature. Size of RL liposomes after filtration was 108.3 nm and polydispersity index was around 0.2 which is in agreement with previously published results and indicates narrow size distribution (7,9). On the other hand, significant chemiluminescence quenching was observed with all liposomal formulations tested. Quantification showed that liposomal preparations possesses 90-110% of initial antioxidant activity of added substances.

REFERENCES

1. Frémont L, Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 2000; 66(8):663 – 73.
2. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997; 275: 218-220.
3. Frankel E, Waterhouse A, Kinsella J. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet.* 1993; 341: 1103–1104.
4. Novakovic A, Gojkovic-Bukarica Lj, Peric M, Nezic D, Djukanovic B, Markovic-Lipkovski J, Heinle H. The Mechanism of Endothelium-Independent Relaxation Induced by Wine Polyphenol Resveratrol in Human Internal Mammary Artery. *J Pharmacol Sci.* 2006; 101: 85-90.
5. Pervaiz S, Holme AL, Aggarwal BB, Anekonda TS, Baur JA, Gojkovic-Bukarica L, Ragione FD, Kim AL, Pirola L, Saiko P. Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(11):2851-97.
6. Kristl J, Teskač K, Caddeo C, Abramović Z, Šentjerc M. Improvements of cellular stress response on resveratrol in liposomes. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009; 73: 253–259.
7. Caddeo C, Teskač K, Sinico C, Kristl J. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. *I J Pharm.* 2008; 363:183–191.
8. Atanacković M, Poša M, Heinle H, Gojković-Bukarica Lj, Cvejić J. Solubilization of resveratrol in micellar solutions of different bile acids. *Colloids surf B: Biointerf.* 2009;72:148–54.
9. Vanaja K, Güzel D, Jandaghi D, Wald K, Wolburg H, Wahl M, Bukarica L, Heinle H. Liposomes as a delivery system for lipid soluble antioxidant resveratrol. In H. Heinle, N. Marx, S. Lorkowski, J. Schäfer. Inflammation, lipids and immunologic reactions during atherosclerosis. *Deutsche gesellschaft für arteriosklerosereforchung, e.V., Tübingen* 2010; 196-201.

PHYSICAL STABILITY ANALYSIS OF TOTAL PARENTERAL NUTRITION ADMIXTURE

Marija Pavlovic¹, Mirjana Antunovic², Dusica Mirkovic², Aleksandar Petrovic³

¹Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Nis,

²Institute of Pharmacy, Military Medical Academy, Belgrade,

³Institute of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, University of Nis, Republic of Serbia

INTRODUCTION

Total parenteral nutrition (TPN) purpose is to provide all nutrients according to individual nutritional needs of every patient whose digestive tract is non-functional or inaccessible^{1,2,3}. All-in-One system (all components are mixed in one bag), is TPN standard, as it maximizes nutrition support by tailoring nutritional formula for each patient requirements^{2,3}. The TPN admixtures are sterile, large volume, complex formulations, containing over 50 individual components (e.g. amino acids, glucose, lipids, electrolytes, trace elements, vitamins and water)^{3,4}. Due to the oil/water emulsion character of TPN admixture, and its multi-composition and chemically reactive nature, its stability can be easily disturbed by physicochemical factors (e.g. low pH, high of concentration cations, trace elements)^{3,5}. Lipid emulsions are thermodynamically unstable systems as two phases tend to separate over time⁶. Creaming can occur without a significant change in mean droplet size (MDS) diameter and TPN admixture can be administered if the fat is first dispersed by gentle shaking, but if coalescence or cracking are present it must not be administered to the patient⁵. Hospital pharmacist is responsible for physicochemical and microbiological stability and safety of TPN admixture which is often extemporaneously prepared and given to patient right away⁴. However, during holidays and weekends, after being prepared, TPN admixtures need to be stored (at 2-8 °C), so their time-dependent stability and expiry date need to be known. Stability refers to TPN admixture being stable during its preparation, storage and administration. The most critical TPN admixtures stability parameter is lipid particle diameter, as lipid emulsion particles greater than 6 μm in diameter can potentially obstruct pulmonary arterioles and accumulate⁵. Lipid droplets diameter must be less than 5 μm (Ph. Jug. IV request), and USP request are MDS < 500 nm and that volume-weight percentage of fat globules (PFAT5) > 5 μm must not exceed 0.05%^{7,8}. Different methods may be used to determine physical stability (particle size and size distribution), but only in laboratory, not in daily clinical practice⁵.

Objectives: To manufacture TPN admixture (with lipid emulsion which declaration claimed expiry date was in 6 months), determine its physical stability (lipid particles diameter and their distribution) in order to state its expiry date.

Materials and methods: The commercial preparations used for preparing the analyzed TPN admixture were: Lipovenoes 10% and Aminosol 15% (by Fresenius Kabii), Glucosi injectio 500 mg/ml, Glucosi infundibile 100 g/l, Natrii chloridi conc. ad infundibile 100 g/l, Kalii chloridi conc. ad infudibile 74, 5 g/l, Calcii chloridi injectio 100 mg/ml, Magnesii sulfatis injectio 250 mg/ml (by Institute of pharmacy, Military Medical Academy). The TPN admixture contained: amino acids 75 g, glucose 250 g, lipids 50 g, electrolytes (90 mmol Na⁺, 50 mmol K⁺, 4 mmol Mg²⁺ and 4 mmol Ca²⁺); total volume was 2009,4 ml. Following protocols for component mixing order and preparation in laminar air – flow environment, TPN admixture was aseptically prepared into ethyl-vinyl ac-

etate (EVA) bag, and after slow homogenization, physical stability of TPN admixture was analyzed just after preparation (0h) and after 24, 48, and 72h. The TPN admixture was kept at 2-8 °C between taking samples that were diluted with sterile water in ratio 1:3 (v/v), and 2 ml were put on microscopic slide, covered with cover slip and immersion oil, and analyzed on light microscope equipped with digital camera. Sample of intact Lipovenoes 10% was previously taken and analyzed, too. For each period, several digital pictures were taken (1000x magnification), and analyzed by Image J, that was set to determine lipid droplets diameter; 100 droplets (including aggregated forms, if present) per picture were chosen by grid option for measuring. The data were sorted to calculate the distribution of lipid particles diameter.

RESULTS AND DISCUSSION

The maximal lipid droplets diameter detected in intact lipid emulsion (Lipovenoes 10%) was close to 3,5 μm, while the most frequent (69,72%) lipids droplets were from 0,5 to 1 μm (Table 1.). The highest percent (71,4%) of same lipid droplets diameter range is present in TPN admixture right after its preparation, too. Commercially available lipid emulsions have a MDS of about 0.25-0.5 μm in diameter, like natural chylomicrons ⁵, but the emulsion we used had MDS diameter of 0.93±0.50 μm and 0,97% of larger droplets (3-4 μm), most likely because of used emulsion age as there were 6 months left before its expiry date. Previous EVA bag homogenization of TPN admixture had caused

Table 1. Percentage of lipid particles diameter in time

Lipid particle diameter (μm)	Intact lipid emulsion: Lipovenoes 10%	TPN admixture Time (h)			
		0	0+24	0+48	0+72
0-0,5	3,91	3	2,8	2,41	1,91
0,5-1	69,72	71,4	71,38	62,67	59,87
1-2	21,82	23	21,37	30,37	31,86
2-3	3,58	2,4	3,38	1,79	2,55
3-4	0,97	0,2	0,48	1,79	0,95
4-5	0	0	0,59	0,97	0,95
> 5	0	0	0	0	1,91
x±SD	0.93±0.50	0.93±0.39	0,94±0,49	1,06±0,56	1,18±0,93

percent of 3-4 μm droplets to be less at start. Although MDS diameter in TPN admixture was similar during first 24h, the particles from 4 to 5 μm are detectable after 24h, and their percent rises over time, plus more and more lipid droplets diameter grows to 2 μm. Despite of larger lipid particles growth, this TPN admixture fulfils pharmacopoeias' requests during first 48h regarding lipid particle diameter (<5 μm)^{7,8}. However, distribution of lipid particles diameter after 72h, shows further decrease of small lipid droplets (<1μm) percents, plus aggregated lipid forms that have exceeded 5 μm in diameter are detected (1,91%) so pharmacopoeias' requests ^{7,8} are not fulfilled. These results confirm this TPN admixture is physically unstable and unsafe for clinical use after 72h, and its expiry date would be 48h.

CONCLUSIONS

The lipid particle diameter distribution is an important parameter for determining physical stability of emulsion systems. The age of used

emulsion should be considered if preparing a TPN admixture that would not be used the same day. We showed that in that case, the TPN admixture prepared by hospital pharmacist could be used during the following 48h, if kept at 2-8 C.

REFERENCES:

1. ASPEN Board of Directors and the Clinical Guidelines Task Force. Guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adults and pediatric patients: administration of specialized nutrition support. JPEN 2002; 26: 18S.
2. Singer P., et al. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: Intensive care. Clinical Nutrition 2009; 28: 387-400.
3. Sobotka L., et al. Basics in clinical nutrition, 3rd edition. Prague: House Galén, 2004; 253-274.
4. Barnett M.I., et al. Basics in clinical nutrition: Parenteral nutrition admixtures, how to prepare parenteral nutrition (PN) admixture. e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism, 2009; 4 (3): e114-e116.
5. Pertkiewicz M., et al. Basics in clinical nutrition: Stability of parenteral nutrition admixtures. e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism 2009; 4: e117-e119.
6. Sinko P.J. Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, fifth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2006; 509-519.
7. Pharmacopoea Jugoslavica. Editio Quarta. Volumen II. Belgrade: Savezni zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja, 1984.
8. United States Pharmacopoeia 26th. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2003.

THE UPDATE OF COSMETIC LEGISLATION IN THE SOUTHERN BALKAN COUNTRIES, AS A NECESSITY IN ORDER TO HAVE SAFE AND EFFECTIVE COSMETIC PRODUCTS

Mirela Miraci, Brunilda Basha Suela Kellici, Vilma Toska,

University of Tirana, Faculty of Medicine, Pharmaceutical Department

SITUATION

As retailers are expanding their presence in the Albania and all over our region, levels of consumer awareness and usage of cosmetic products are increasing. Product lines, which have reached maturity in Western Europe, can potentially be shifted to Eastern Europe into a young and growing market, but consumers exhibit low brand loyalty and the prime consumption criterion is price. The Albanian cosmetic legislation cannot protect human health from fake products or other harmful products as it is. They go straight to consumers' hand.

In this situation we undertook this investigation on how it works the cosmetic market in our neighbor countries and found out quite the same situation. Albania and Macedonia are emerging markets in which the cosmetics "boom" has not yet started, but is likely to come. Legislation drives the market but if companies are not proactive in complying with it can also become a restraint for growth.

OBJECTIVES

the aim of this study is to ensure safe and effective cosmetic products to our customers. We're intending to do reach this objective via the following steps: first to get to know the real situation on cosmetic market in Albania. Second: compare it with Macedonia, Montenegro, Third: furnish an overview of cosmetic legislation in EU, USA and China. The final objective is to suggest which one is best to be implemented in Albania.

MATERIALS AND METHODS:

EU Cosmetics Directive 2004/27/EC [3] The Commission proposal for a "Cosmetics Regulation" was adopted on 5 February 2008 with the primary aim to remove legal uncertainties and inconsistencies as highlighted by the large number of amendments (55 to date) and the complete absence of any set of definitions. Several measures are included to facilitate management of the Cosmetics Directive with regard to implementing measures. In addition, the aim of the simplification is to avoid divergences in the incorporation of the provisions of the EU directive into a Member State's domestic law ensuring the product safety and avoiding additional regulatory burden and administrative costs. Finally, the role of the Cosmetics Directive is to ensure that cosmetic products placed on the EU market are safe in the light of innovation in this sector.[5] **USA: FD & Cosmetic Act China Regulation on Cosmetics**

RESULTS AND DISCUSSION

Labeling: EU countries apply the article 6 of Eu Cosmetics Directive. The cosmetic label should include ManS, MAH, Batch no, qty., prod date, exp date, use and warnings. The list of ingredients in the descending order is a must. USA FDC-Act has the same requests as EU directive. It relies on FPLA. While in China the cosmetic label should include ManS, MAH, Batch no, qty., prod date, exp date, use and warnings. The list of ingredients is not requested. Regarding *registration of cosmetic products* in EU an USA is not necessary.[2] While in China it depends on the product. Only special cosmetic products must be registered. The company, for all other products, must only notify the health authorities that is placing in the market a new cosmetic product. If they want to import such a product the company must have a special permission from MoH.[4] **Ingredients of cosmetic product:** Both USA and EU have a negative list and a positive list of excipients while China rely on EU negative list, has its own positive list and is preparing a definitive list. Every new substance must be approved by MoH while this is not necessary in EU and USA. The producer is responsible for the safety and efficacy of a new ingredient In Albania there are only 2 official companies producing cosmetic products. Most part of cosmetic products in the market are imported. Albanian companies import cosmetics on the bases of documentation (Invoice, packing list, Certificate of Origin). [6] The authorities don't exercise any physical chemical control of these products. During this investigation it was found out that the same situation on cosmetics exists in Macedonia and Republic of Kosovo.

CONCLUSION

Albania needs to implement the EU legislation. Accompanying these regulatory measures with randomized physical chemical control, would guarantee safety and effectiveness of cosmetic products. This way we will protect the health of Albanian customers.

REFERENCES

1. COLIPA's Response to Consultation for Comparative Study on Cosmetic Legislation. COLIPA, Belgium. 2004;
2. CFTA International Regulatory Resource Manual, 5th Eds, CFTA USA. 2001
3. Directive 2004/27/EC EC Belgium 2004
4. Particulars of Implementation of Production Licence of Cosmetics SFDA China 1994.
5. Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council. EC, 2003
6. Regulation on import of cosmetic products in Albania.

A COMPARISON BETWEEN RANITIDINE 150MG FILM-COATED TABLETS OF DIFFERENT BALCAN MANUFACTURERS WITH THE PATENTED DRUG USING 'IN VITRO' DISSOLUTION TEST

Ledjan Malaj, Delina Hudhra

Universiteti i Tiranës, Fakulteti i Mjekësisë, Departamenti i Farmacisë 'Pirro Goda'

INTRODUCTION

In recent years, the Drug Regulatory Agencies have placed more emphasis on a dissolution profile comparison in the area of post-approval changes and generics. Under appropriate test conditions, a dissolution profile can characterize the product more precisely and helps to assure similarity in product performance and signals bioequivalence. The purpose of this study was to compare the dissolution profiles of different Balcan productions of ranitidine 150 mg film-coated tablets to the reference and see if there is any difference between the Balcan production and the patented drug.

MATERIAL AND METHODS

Four different Balcan manufacturers of Ranitidine 150 mg film coated registered in Albania and the patented Ranitidine of British manufacturer were taken in consideration. In addition, their costs per dosage form unity and intra-day have been compared. Tablet dissolution was carried out in a multibath (n=6) dissolution test system (Varian Dissolution Apparatus) in accordance with the USP general methods. The apparatus 2 was used with a stirring speed of 50 rpm. The dissolution medium, bidistilled water (pH 7.0), was thermostated at 37.0±0.5 °C. An UV-Vis spectrophotometer (Cary 100, Varian) was used to determine ranitidine concentration at wavelength 315 nm. The similarity between dissolution profiles of two given drugs indicates their bioequivalence. Moore e Flanner have proposed an independent mathematical pattern to compare the dissolution profiles using two factors f1 equation (1) and f2 equation (2).

$$f_1 = \left\{ \left[\sum_{t=1}^n n |R_t - T_t| \right] / \left[\sum_{t=1}^n n R_t \right] \right\} \cdot 100 \quad \text{Eq (1)}$$

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + (1/n) \sum_{t=1}^n n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \right\} \cdot 100 \quad \text{Eq (2)}$$

RESULTS

From the obtained values (f1; f2), it can be assumed that dissolution profiles between the patented drug and the Balcan productions are not comparable, whereas those between Balcan tablets were not significantly different. However, all brands complied with USP 29 specification.

CONCLUSION

The dissolution profile comparison is an important indicator of 'quality' and furthermore an evaluation of cost - quality of these tablets on Albanian market showed that there is a positive correlation between quality and price.

REFERENCES

- U. S. Pharmacopoeia, 29th Revision (2006).
www.moh.gov.al/
WHO Technical Report Series, No. 937, Annex 8 (2006)
www.gsk.com
GRAHAM L. PATRICK 'An Introduction to Medicinal Chemistry', OXFORD UNIVERSITY PRESS, 1995, p308
Prof. John A. Henry 'Concise guide to medicines and drugs', The British Medical Association, DK 2001, p355
H.P.Rang, M.M.Dale, J.M.Ritter, R.J. Flower, 'Farmacologia', sesta edizione, Elsevier Masson 2008, p388
Polli et al. J. Pharm. Sci. 86, 690-700 (1997).
Katzung, 'Farmacologia generale e clinica', VII edizione italiana, Piccin 2009
D.A.Williams, TH.L.Lemke, 'Foye's principi di chimica farmaceutica', IV edizione italiana, Piccin 2005, p808
Yihong Qiu, Yisheng Chen, Lirong Liu, Geoff G. Z. Zhang 'Developing solid oral dosage forms: pharmaceutical theory and practice', Elsevier 2009, p320
Annex 7. Multisource (Generic) Pharmaceutical Products: Guidelines on Registration Requirements to Establish Interchangeability. WHO Technical Report Series, No. 937
I. E. Smekhova, B. L. Moldaver, and Yu. M. Perova, 'Equivalence of ranitidine generic tablets studied using the in vitro dissolution test' Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal, Vol. 43, No.11, pp. 44 - 48, November, 2009
L. X. Ju, J. T. Wang, and A. S. Hussain, AAPS PharmSci, 4(1), 1 - 5 (2002).
P. Colombo, P.L. Catellani, A. Gazzaniga, E. Menegatti, E. Vidale, 'Principi di Tecnologie Farmaceutiche', Casa Editrice Ambrosiana 2004, p.311.

A COMPARISON BETWEEN DSC AND HPLC METHODS IN ASSESSING DRUG-EXCIPIENT COMPATIBILITY

Ela Hoti¹, Ledjan Malaj¹, Suela Kelliç¹, Piera Di Martino²

¹Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Tirana, Albania

²Department of Chemical Sciences, University of Camerino, Italy

INTRODUCTION

An important issue during preformulation studies is the identification of possible incompatibilities between the active pharmaceutical ingredient (API) and various excipients. The aim of this study is to find and optimise methods by which drug-excipient compatibility can be reliably and quickly assessed. Two different experimental techniques Differential Scanning Calorimetry (DSC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) were used to investigate the compatibility between different APIs and some currently employed excipients.

MATERIALS AND METHODS

Compatibility studies were conducted on APIs as ibuprofen, nimesulide, and excipients like magnesium stearate, lactose monohydrate and polyvinylpyrrolidone (PVP). Each active ingredient was mixed in a 1:1 ratio with every different excipient. The influence of processing effects (simple blending, co-grinding, kneading or tableting) on drug stability, were also evaluated. The mixtures as well as the pure substances were analysed with both DSC and HPLC at time = 0, stored in plastic eprouvets at room temperature, and re-analysed to evaluate their stability after 6 months.

RESULTS

The results obtained were attentively evaluated considering the specifics of each technique. The outcome of the DSC analysis for all ibuprofen-magnesium stearate and ibuprofen-PVP mixtures revealed incompatibilities between the drug and the excipient. The results were

confirmed even in the stored samples analyzed after 6 months. Additionally, the DSC analysis of the mixtures containing nimesulide and excipient showed physical interaction and chemical instability between nimesulide and PVP. The interaction intensified after 6 months. On the other hand, during the evaluation of the chromatograms obtained with HPLC, differences were observed only in the mixtures containing ibuprofen-PVP. The small peak at the retention time of 4.14 minutes is present in all the chromatograms of the mixture before and after the storage, but it is more evident in the mixture processed with co-grinding.

CONCLUSION

The DSC analysis is being proposed as a substitute to accelerated stability test. However, it has some limitation related to the difficulties encountered in the interpretation of the thermograms, being based mostly in the thermal characteristics of the pure substance. Moreover, it points out mainly qualitative rather than quantitative effects. The identification of degradation products is one of the advantages of HPLC. This technique can detect degradation products that have been formed during the experiment. Therefore, the techniques investigated were able to provide different but complementary information, enabling a complete understanding of the possible interactions that occurred in the binary mixtures drug-excipient.

REFERENCES

- Bruni, G.; Amici, L.; Berbenni, V.; Marini, A.; Orlandi, A. Drug-Excipient compatibility studies search of interaction indicators. J. Therm. Anal. Calorim., 68, 561-573 (2002).
Balestrieri, F.; Magri, A.D.; Magri, A.; Marini, D.; Sacchini, A. Application of differential scanning calorimetry to the study of drug - excipient compatibility. Termochim. Acta, 285, 337-345 (1996).
Botha, S.A. and Lotter, A.P. Compatibility study between naproxen and tablet excipients using differential scanning calorimetry. Drug Dev. Ind. Pharm., 16, 673-683 (1990 b).
Botha, S.A. and Lotter, A.P. Compatibility study between oxprenolol hydrochloride, temazepam and tablet excipients using differential scanning calorimetry. Drug Dev. Ind. Pharm., 16, 331-345 (1990 a).

COMPOUNDING SORBITOL-MANNITOL IRRIGAN FOR TRANSURETHAL SURGICAL PROCEDURES IN HOSPITAL PHARMACY

Elena Najdovska, Zora Veljanova

Clinical Hospital, Department for Compounding Sterile Products, Bitola

INTRODUCTION

Transurethral resection of the prostate involves resection of the prostate (TURP) by modified cystoscope, which cuts tissue and coagulates blood vessels. The procedure is facilitated by means of irrigating fluid that flows through the cystoscope. This fluid washes blood away from the cut prostatic tissue so that operative site can be seen. Requirements for urological irrigating fluids are:

- » Prevents dispersal of electrical current
- » Clear for visibility
- » Sterile
- » Nontoxic locally
- » Nontoxic systemically
- » Isotermic
- » Isonic (or slightly hypotonic)

- » Nonhaemolytic
- » Inexpensive

TURP requires large amounts of irrigation fluid. The absorption of this fluid can cause TUR-syndrome because of its effects on the cardiovascular and nervous system (cardiovascular – system problems following rapid fluid –electrolyte balance changes, resulting from absorption of irrigation fluid, dilution of proteins and electrolytes in body fluids, deterioration of renal functions). The most widespread solute used is Mixture of Sorbitol-Mannitol.

OBJECTIVES

The fact that is lack of Sorbitol-Mannito Irrigant on the drug market in our country, the aim of presented work was to create the conditions to start small scale productions of our first batch of this formulation and to evaluate its quality and stability.

METHODS

Sorbitol-Mannitol Irrigation is a sterile, nonpyrogenic, hypotonic, aqueous solution for urologic nonelectrolyte irrigation during transurethral surgical procedures. Each 100 ml contains sorbitol 2,70 g. and mannitol 0,54 g. in water for injection. The solution is nonelectrolytic and hypotonic (178 mOsmol/l); pH 5,2 (4,0-7,0). The solution contains no bacteriostat, antimicrobial agent or added buffer and is intended only for use as a single-dose irrigation. When smaller volumes are required the unused portion should be discarded.

The minimum conditions required for the small scale production were researched:

- » The Responsible Person has relevant knowledge and current practical and theoretical experience in the preparation of sterile products
- » All preparation is caring out by appropriately trained personnel
- » Premises are situating in an environment witch, presents minimal risks of causing contamination of material and products
- » Sterile preparation is caring out in clean dedicated areas
- » Standard Operating Procedures are written and implemented for all equipment used for processing
- » Clean areas are regularly cleaned according to a documented and approved procedure.

The main steps of the production process were:

- » calculations
- » pharmaceutical validation
- » compounding
- » labeling
- » storage
- » distribution
- » administration

RESULTS

The formulation must be prepared in laminar flow cabinet, using an aseptic technique together with sterile filtration is used to fill the sterile primary packaging. Solution is sterilized by autoclaving. The final solution is then submitted to quality control, where a set of selected assays have been defined that ensures both raw material and final products are of assured quality. The formulation manifested good quality in respect to physical properties, physicochemical parameters and microbiological quality according to USP. The dosage form was stable for a year storage in our conditions.

Conclusion

It was possible to accomplish this challenge, and create the conditions to start the small scale productions of this formulation: Sorbitol-Man-

nitol Irigant for transurethral surgical procedures in our Department for Compounding Sterile Products.

REFERENCES

1. Handbook of Extemporaneous Preparation; A Guide to Pharmaceutical By Mark Jackson (Editor), Andrew Lowey (Editor)
2. Pharmaceutical Compounding and Dispensing John F., PhD Marriot (Autor); Keith A. PhD Wilson (Autor) Christopher Andrew Langley (Autor); Daw Belcher (Autor)
3. USP chapter <797>
4. <http://www.picscheme.org>
5. mhtml://H:/New folder/Teaching goals and learning objectives - BEAM 2010
6. Webber R (2006). Benign prostatic hyperplasia, search date May 2005. Online version of BMJ Clinical Evidence. ce.com. Also available online: <http://www.clinicalevidence>
7. Fitzpatrick JM (2007). Minimally invasive and endoscopic management of benign prostatic hyperplasia. In AJ Wein, ed., Campbell-Walsh Urology, 9th ed., vol. 3. pp. 2803-2844. Philadelphia: Saunders Elsevier
8. Brookes ST, et al. (2002). Sexual dysfunction in men after treatment for lower urinary tract symptoms: Evidence from randomised controlled study. BMJ, 324(7345): 1059-1061.
9. Paterson R, Goldenberg L (2001). Benign prostatic hyperplasia. In J Teichman, ed., 20 Common Problems in Urology, part 2, pp. 185-198. New York: McGraw-Hill.

МАГИСТРАЛНА ПРИПРЕМА НА СОРБИТОЛ-МАНИТОЛ ИРИГАЦИЈА ЗА ТРАНСУРЕТРАЛНА ХИРУРШКА ИНТЕРВЕНЦИЈА ВО ИНФУЗИОНО ОДДЕЛЕНИЕ ПРИ КЛИНИЧКАТА БОЛНИЦА-БИТОЛА

Елена Најдовска, Зора Велјанова

Инфузионо одделение, Клиничка болница Битола

ВОВЕД

Трансуретралната ресекција на простата, вклучува ресекција на простатата (ТУРП) со модифициран цистоскоп, кој го реже ткивото и ги коагулира крвните садови. Процедурата е олеснета со употреба на иригационо средство кое тече низ цистоскопот. Оваа течност го испира ткивото и овозможува прегледност на операционото поле. Иригацијата мора да ги исполнува следните услови:

- » да препречува спроведување на електричната струја
- » бистрина на препаратот
- » стерилност
- » нетоксичност локално
- » нетоксичност системски
- » изотермичност
- » изотоничност (или слабо хипотонично)
- » нехемолитичност

ТУРП потребува големи количини на иригационо течност. Абсорпцијата на оваа течност може да предизвика ТУР-синдром, заради ефектот врз кардиоваскуларниот и нервниот систем (кардиоваскуларен систем-системски проблеми заради брзо менување на електролитскиот баланс, резултат од абсорпцијата на иригацијата, разредување на протеините и електролитите во телесните течности, нарушување на реналната функција). Една од најпотребните иригации за оваа намена е Сорбитол-Манитол иригацијата.

ЦЕЛ

Нередовното снабдување на нашиот пазар со Иригацијата Сорбитол-Манитол, која е неопходна за ТУРП, наведе на поставување цел: создавање услови и отпочнување со магистрално производство(производство во мал обем) на оваа формулација, како и евалуација на квалитетот и стабилноста на производот.

МЕТОДИ

Сорбитол-Манитол Иригацијата е стерилен, апиrogen, хипотоничен воден раствор за уролошка употреба како неелектролитска иригација за време на трансуретралната хируршка процедура.

100 мл раствор содржи: 2,70 г. сорбитол и 0,54 г. манитол во вода за инекции. Растворот е неелектролитски и хипотоничен (178 мОсмол/л), рН=5,2(4,0-7,0). Растворот не содржи бактериостатици, антимикробни средства и пуфери и е наменет само за еднакратна употреба. Доколку останат мали порции од препаратот не смеат да се употребат за друг пациент туку мора да се фрлат.

Минимум услови за магистрално производство беа постигнати:

- » одговорниот фармацевт е со релевантно знаење од областа и има практично и теоретско искуство за производство на стерилни препарати.
- » сите операции се изведуваат од соодветно трениран персонал
- » опремата е сместена во простории кои оневозможуваат контаминација на препаратот
- » стерилното производство се одвива во чисти простории
- » стандардни оперативни процедури се напишани и применети за опремата и процесот на производство
- » во просториите се одржува хигиената соодветно на пишаните и одобрени процедури

Главните чекори во процесот на производство се:

- » математички прорачуни
- » фармацевтска валидација
- » магистрална припрема
- » сигналирање
- » складиштење
- » дистрибуција
- » водење документација

РЕЗУЛТАТИ

Формулацијата мора да биде припремена во Ламинар-фло кабинет, употребувајќи асептична постапка на изработка, како и бактериолошка филтрација. Растворот се стерилизира со автоклавирање. Финалниот производ се контролира со соодветни контролни постапки кои докажуваат дека и влезните суровини и процесната анализа и готовиот производ се со дефиниран квалитет. Формулацијата покажа добар квалитет како во поглед на физичките особини, така и во поглед на физичко-хемиските и микробиолошките параметри према УСП. Дозираната фармацевтска форма е стабилна една година од денот на производство-ускладиштена при наши услови.

ЗАКЛУЧОК

Беше можно да се прифати предизвикот и создадат услови за магистрална припрема на формулацијата: Сорбитол-Манитол Иригација за трансуретрална хируршка интервенција во Инфузионото одделение при нашата Клиничка болница

ЛИТЕРАТУРА

1. Handbook of Extemporaneous Preparation; A Guide to Pharmaceutical By Mark Jackson (Editor), Andrew Lowey (Editor)
2. Pharmaceutical Compounding and Dispensing John F., PhD Marriot (Autor); Keith A. PhD Wilson (Autor) Christopher Andrew Langley (Autor); Daw Belcher (Autor)
3. USP Chapter <797>
4. <http://www.picscheme.org>
5. mhtml://H:/New folder/Teaching goals and learning objectives -BEAM 2010
6. Webber R (2006). Benign prostatic hyperplasia search date May 2005. Online version of BMJ Clinical Evidence. ce.com. Also available online: <http://www.clinical.eviden>
7. Fitzpatrick JM (2007). Minimally invasive and endoscopic management of benign prostatic hyperplasia. In AJ Wein, ed., Campbell-Walsh Urology, 9th ed., vol. 3. pp. 2803-2844. Philadelphia: Saunders Elsevier
8. Brookes ST, et al. (2002). Sexual dysfunction in men after treatment for lower urinary tract symptoms: Evidence from randomised controlled study. BMJ, 324(7345): 1059-1061.
9. Paterson R, Goldenberg L (2001). Benign prostatic hyperplasia. In J Teichman, ed., 20 Common Problems in Urology, part 2, pp. 185-198. New York: McGraw-Hill.

TOPICAL PREPARATIONS OF ALLICIN AND ALLICIN TRANSFORMERS: ANTIMICROBIAL AND ANTI-IRRITATING EFFECTS

Vesna Savić¹, Dušica Ilić², Vesna Nikolić², Ljubiša Nikolić², Mihajlo Stanković², Ljiljana Stanojević², Marija Tasić-Kostov¹

¹Faculty of Medicine, Department of Pharmacy, Nis;

²Faculty of Technology, Leskovac

INTRODUCTION

Allicin (diallyl thiosulfinate) is pharmacologically active component of garlic (*Allium sativum* L.). Pharmacological effects of allixin are manifested in: stroke [1], coronary thrombosis [1-3], hypertension [3,4], cancer [3]. Allixin is active against the most Gram-positive and Gram-negative bacteria [5-10]. Fungi such as *Candida albicans* and *Aspergillus niger* are sensitive to allixin [5,10,11]. Allixin is unstable organic molecule which is transformed to derivatives after application. Reaction depends from external factors. The best known pharmacological active derivatives of allixin are ajoen [(E, Z)-4,5,9-thiododeca-1,6,11-trien-9-oxide] and vinylthiini compounds [2-vinyl-4H-1,3-dithiini and 3-vinyl-4H-1,2-dithiini] [12]. Ajoens affect a large number of bacteria, viruses, fungi and parasites [7]. It is proven that they are the main inhibitors of platelet aggregation [13]. Vinylthiini participate in the inhibition of platelet aggregation, inhibition of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase in the regulation of systolic and diastolic blood pressure [14]. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial and anti-irritating effects of the preparations with synthesized Allixin and its transformers formulated in hydrogel basis with Carbopol® Ultrez 10 polymer.

METHODS

Allixin was synthesized according to the procedure presented in the literature [5]. Allixin transformation was carried out in methanol at 550 °C under the effect of microwaves ("Discover" focus microwave reactor, CEM Corporation, Matthews, NC, USA). Hydrogel containing Carbopol® Ultrez 10 polymer (0.3%) with incorporated active ingredients (Allixin and Allixin transformers) was prepared. Anti-irritating activity was tested *in vivo* on artificially irritated skin. Non-invasive bioengineering method was used. *In vivo* testing was performed on six healthy male subjects. The artificial arm skin irritation was caused in four places by 50 µl of sodium lauryl sulfate solution in the concentration of 12% using the method of occlusion [15]. The effect of placebo and gel with active substances (allixin or its transformers in the concentration of 0.3%) on irritated skin was evaluated by biophysical parameters of the skin (skin hydration, melanin index and erythema index) [16,17]. Subjective evaluation by examining the participants using the evaluation erythema-visual analog scale (VAS) was done [17]. Antimicrobial effects of topical preparation with Allixin and its transformers on bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, ATCC 700603 *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 and fungi: *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 was tested. Antimicrobial efficacy of preparations was tested by the membrane-free agar diffusion method. *In vitro* testing was performed on nutrient media: Mueller Hinton Agar (MHA-Oxoid) (for bacteria) (pH value after sterilization was 7.2) and for

the fungi Tryptone soy agar (Torlak Institute of Immunology and Virology, Belgrade) into Petri plates (8 cm in diameter).

RESULTS AND DISCUSSION

After artificial irritation only in one patient all from the four treated places were determined with value 2 by subjective evaluation on the visual irritation scale, which corresponds to moderate irritation. Preparation with the Allixin showed the highest rate of reduction the melanin index. The increasing in values of electrical capacity index as a measure of skin hydration and decreasing in values of erythema index was the most obvious after the application of preparations containing Allixin transformers. That indicates that preparation with Allixin transformers has the greatest anti-irritating effect. Allixin and Allixin transformers incorporated in hydrogel basis were active against all tested microorganisms.

CONCLUSION

The preparation containing Allixin was the most active against *Staphylococcus aureus*, and the preparation containing Allixin transformers was the most active against *Escherichia coli*. *Pseudomonas aeruginosa* was nearly resistant to both preparations. Also, the both preparations showed the strongest antifungal activity against *Candida albicans*. Hydrogel basis with Carbopol® Ultrez 10 polymer do not reduce the antimicrobial and anti-irritating activity of Allixin and its transformers and are suitable for making preparations for external use with the active substances which was tested in our study.

REFERENCES

1. Block E., Ahmad S., Catalano J.L., Jain M.K., Apitz-Castro R., J. Am. Chem. Soc. 108 (1986) 7045-7055.
2. Fujisawa H., Suma K., K Origuchi., Kumagai H., Seki T., Ariga T., J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 4229-4235.
3. Lawson L.D., ACS Symposium Series, No 691. Washington, DC: American Chemical Society, (1998) 176-209.
4. Miller K.L., Liebowitz R.S., Newby L.K., Am. Heart J. 147 (2004) 401-411.
5. Nikolić V., Stanković M., Nikolić Lj., Cvetković D., Pharmazie, 59 (2004) 10-14.
6. Ilić D.P., Nikolić V.D., Nikolić Lj.B., Stanković M.Z., Stanojević Lj.P., Chem. Ind. 6 (2010) 85-93.
7. Amagase H., Petesch B.L., Matsuura H., Kasuga S., Itakura Y., Journal of Nutrition, 131 (2001) 955S-962S.
8. Ross Z.M., O'Gara E.A., Hill D.J., Sleightholme H.V., Maslin D.J., Applied and Environmental Microbiology, 67 (2001) 475-480.
9. Chen Yu-Ying, Chiu Hsein-Chung, Wang Yi-Bing, Journal of Food and Drug Analysis, 17 (2009) 59-63.
10. Uchida Y., Takahashi T., Sato N., Japanese Journal of Antibiotics, 28 (1975) 638-642.
11. Nikolić V., Stanković M., Nikolić Lj., Cvetković D., Kapor A., Cakić M., Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly, 2 (2005) 69-73.
12. Sticher O., Dtsch. Apoth. Ztg. 131, (1991) 403-413.
13. Yamada N., Hattori A., Hayashi T., Nishikawa T., Fukuda H., Fujino T., Pharmacology Biochemistry and Behavior, 78, (2004)787-791.
14. Sanchez-Moreno C., Food Science and technology International 8, 3 (2002)121-137.
15. Fleming A., et al.:Anti-irritants II:efficacy against cumulative irritation,Contact Dermatitis, 2006;55:155-159.
16. Carrys P. et al.:Skin color measurements, Skin Research and Technology,6,2000.,230-238.
17. Veber T.M. et al.:Skin tolerance,efficacy,and quality of life patients with red facial skin using a skin care regimen containing Licochalcone A,Journal of Cosmetic Dermatology2006,5,227-232
18. Information and Operating Instruction for the Multi Probe Adapter MPA,CK,03/2008

THE MINERAL MUD IN DERMOCOSMETIC PREPARATIONS IN TREATMENT OF ACNE

Potpara Zorica 1,2, Janković Slobodan 3

¹ Fontis Ltd., Podgorica, Montenegro

² Faculty of Pharmacy of the University of Montenegro

³ Medical Faculty, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

INTRODUCTION

One of the most frequent skin diseases in adolescence is acne, affecting as much as 85% of that population. In spite of a variety of established therapeutic approaches to treatment of acne vulgaris, up to 12.7% of patients could not be cured. In order to overcome limitations of the established therapy, botanicals and natural preparations of mineral origin are also used in therapy of acne. The aim of our study was to investigate efficacy of topical therapy of acne with preparation made by combination of peloid and medicinal plants from Montenegro.

METHOD

The study was designed as retrospective cohort study, with two cohorts defined by the type of topical preparation used: one cohort (n = 70) comprised of the patients treated with Peloderm (topical preparation containing both peloid and medicinal plants' extracts), and another cohort (n = 70) of the patients treated by Antiacne (topical preparation with only medicinal plants' extracts). The patients in both cohorts were treated for 18 months.

RESULTS

In both treatment groups, the FDA acne severity score improved gradually throughout the study visits. However, final FDA score (after 18 months of topical treatment) was significantly ($T = 7.556$, $df = 1$, $p = 0.000$) lower in the Peloderm group (1.0 ± 0.0) than in the Antiacne group (1.8 ± 0.9).

CONCLUSION

Both peloid and selected medicinal plants from Montenegro, prepared as topical preparations in ratios observed in this study, are efficient and safe options for local treatment of acne, the peloid having somewhat greater potency.

REFERENCES

1. Tan JKL. Current Measures for the Evaluation of Acne Severity. *Expert Rev Dermatol* 2008; 3: 595-603.
2. Stern RS. The prevalence of acne on the basis of physical examination. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26: 931-935.
3. Ayer J, Burrows N. Acne: more than skin deep. *Postgrad Med J* 2006; 82: 500-6.
4. Sardana K, Garg VK, Sehgal VN, Mahajan S, Bhushan P. Efficacy of fixed low-dose isotretinoin (20 mg, alternate days) with topical clindamycin gel in moderately severe acne vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23: 556-60.
5. Shaughnessy KK, Bouchard SM, Mohr MR, Herre JM, Salkey KS. Minocycline-induced drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) syndrome with persistent myocarditis. *J Am Acad Dermatol* 2010; 62: 315-8.

LEGISLATION AND RECOMMENDATIONS OF THE EUROPEAN UNION IN DETERMINING THE IRRITATION POTENTIAL OF COSMETIC INGREDIENTS

Milica Stanković¹, Vesna Savić¹, Valentina Marinković²

¹ Faculty of Medicine, Department of Pharmacy, University of Niš

² Faculty of Pharmacy, University of Belgrade

INTRODUCTION

In our country there is no legislation about irritation potential of cosmetic products. There are only the recommendations of the European Union which help us to determine the irritation potential of cosmetic products. Every cosmetics product on the market should be safe to use. European Union legislation requires all new products to undergo an expert scientific safety assessment before they are launched for sale. Scientific research and development is essential to the cosmetics industry. The EU Cosmetics Directive protects consumers and requires cosmetics to cause no damage to human health when applied under normal or reasonably foreseeable conditions of use [1].

ANIMAL TESTING

Animal models are important tools for studies in skin physiology and pathophysiology. Due to substantial differences in skin characteristics such as thickness and number of adnexa, the results of animal studies cannot always be directly transferred to the human situation [2]. Efforts to replace the rabbit skin irritation test have been underway for many years. Recently various *in vitro* tests have been developed, evaluated and validated. A key difficulty in confirming the validity of *in vitro* methods is that animal data are scarce which adversely impacts their acceptance. The Draize test for skin irritation was developed in order to predict skin irritation hazard of formulations that come intentionally or accidentally into contact with human skin. The rabbit method has been criticised for low predictivity and questionable relevance towards humans, as well as for high subjectivity associated with grading of reactions, the omission of distinct irritation end-points because the grading is based only on erythema and oedema, and finally for low reproducibility. Although the animal test proved to be useful in identification of majority of strongly irritating chemicals, still it was failing to correctly predict human non-responsiveness to compounds slightly irritating in rabbits. Studies on human volunteers concluded that the *in vivo* rabbit test often overpredicts the severity of skin reactions and damage produced by irritants [3]. Animal testing is a highly sensitive subject, particularly when it comes to cosmetics. Colipa (the European Cosmetics Association) is working to develop alternative testing methods [1].

ALTERNATIVE METHODS

Recently adopted legislation in Europe has increased the focus that must be placed on the development of *in vitro* alternatives to the traditional toxicology tests [4]. *In vitro* or *in silico* alternatives which can identify the significant acute human skin irritants may well represent suitable alternatives [1, 4]. Patch testing with sodium lauryl sulphate for the evaluation of skin susceptibility has become a widely used procedure in studying irritant contact dermatitis. In patch testing effects of occlusion on hydration and barrier function of the skin must

be taken into account. The water content of the *stratum corneum* plays an important role in the skin barrier function and hence in the penetration of topically applied substances [5]. The human patch test allows avoidance of the use of animals, provides an appropriate route to accurate classification of skin irritation and generates the quality of data, which can then be used to validate the *in vitro* alternative methods which is demanded by recent EU legislation [4]. Various *in vitro* tests have been developed, but the best results have been obtained using reconstructed human epidermis (RhE) models. ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) initiated a validation trial with the three most promising *in vitro* tests: SIFT test and two RhE-based methods. Because the *in vivo* rabbit skin irritation test is the regulatory accepted method for classification and labelling of chemicals, the ECVAM decided to use results of this test as the *in vivo* gold standard [3]. For skin irritation, the approach which is recommended uses human volunteers with the acute irritant response in skin as the endpoint. The test is robust in terms of interlaboratory reproducibility and that the results are applicable to all skin types and populations tested [4]. The alternative methods like cytotoxicity test on human keratinocytes and fibroblast or human skin models are useful [6]. Transplantation of human skin on to SCID (Severe Combined Immunodeficiency) mice might offer a promising tool to perform studies in viable human skin without the direct need for human volunteers [2].

BIOENGINEERING TECHNIQUES

The *in vivo* irritation potential of topical products is assessed by the method of dermatological visual score or applying the objective skin bioengineering techniques (erythema index, transepidermal water loss measurements) after the skin occlusion or during the patch test [6]. Bioengineering techniques are increasingly being used in order to provide important useful information on the different aspects of skin function. These non-invasive techniques have the advantage of producing objective readings in contrast to the subjective nature of clinical observations [7]. Bioengineering methods indicating inflammatory responses (measurement of blood flow and skin thickness) are helpful in quantifying the irritant response in general, while bioengineering methods indicating epidermal damage (measurement of TEWL and electrical conductance) are helpful in classifying the individual irritants [8]. For the assessment of low irritant skin reactions, measurement of the TEWL appears to be the most valid bioengineering method quantifying the skin reaction to irritants [5].

CONCLUSION

The knowledge gained by this global research effort and the synergies that should appear will allow the development of novel *in vitro* approaches for the identification and characterization of skin irritating chemicals. The overall strategic goal is to develop a battery of *in silico* / *in vitro* predictive assays that could be used in concert to identify and potentially quantify the potential of a novel chemical to induce skin irritation in human. In this way we aim to generate data to support skin irritation consumer safety risk assessment decisions in the absence of animal testing [9].

REFERENCES

1. Skin Bioengineering: Techniques and Applications in Dermatology and Cosmetology. (Elsner P, Barel AO, eds), Current Problems in Dermatology, Karger, 2003: Vol 26.
2. Kappes U., Schliemann-Willers S., The quality of human skin xenografts on SCID mice: a noninvasive bioengineering approach, Br J of Derm 151 (2004) 971-976.
3. Jiroval D., Basketter D., Liebsch M., Comparison of human skin irritation patch

- test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, Contact Dermatitis 62 (2010) 109-116.
4. Basketter D. A., York M., Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test, Contact Dermatitis 51 (2004) 1-4.
5. Friebe K., Effendy I., Loffler H., Effects of skin occlusion in patch testing with sodium lauryl sulphate, Br J of Derm 148 (2003) 65-69.
6. Savić S., Bioavailability and safety of dermatological drugs and dermocosmetic products: methods of *in vitro*/*in vivo* evaluation, Arh farm 60 (2010) 712 - 713.
7. Yosipovitch G. Bioengineering techniques in contact dermatitis. In: The Principles and Practice of Contact and Occupational Dermatology in the Asia-Pacific Region. (Ng SK, Goh CL, eds), World Scientific Singapore, 2001; 217- 221.
8. Agner T., Serup J., Skin reactions to irritants assessed by non-invasive bioengineering methods, Contact Dermatitis, 20 (2005) 352-359.
9. Pierre A., Takao A., Skin Sensitization: The Colipa strategy for developing and evaluating non-animal test methods for risk assessment, Br J of Derm 45 (2009) 45-53.

IN VITRO / IN VIVO CORRELATION BETWEEN TWO LAMOTRIGINE ORAL FORMULATIONS

Lalic-Popovic M.¹, Golocorbin-Kon S.1,2, Mikov M.³

¹Department of Pharmacy, Medical Faculty, University of Novi Sad, Serbia,

²Faculty of Pharmacy, Podgorica, University of Montenegro

³Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Medical faculty, University of Novi Sad, Serbia

INTRODUCTION

Epilepsy is a chronic disease that often requires life-long antiepileptic drug (AED) treatment. The primary goal of AED treatment is the avoidance of seizures with no or minimal adverse effects. When long-term seizure remission has been achieved, even a single breakthrough seizure can have serious clinical and social consequences. Healthcare systems tend to favor the use of generic drugs in order to reduce medical costs, despite a number of potential disadvantages of generic drugs. In the treatment of epilepsy, generic formulations of AEDs are widely used. Although generic substitution of AEDs may be appropriate for many patients, there appear to be a substantial number of patients in whom generic substitution may represent a suboptimal level of care. Since 2005, the antiepileptic drug lamotrigine has been present in the market in various generic products, in addition to the original brand of Lamictal®. The linear pharmacokinetics and wide therapeutic window of lamotrigine enable seizure-free patients to easily switch from brand to generic antiepileptic drugs.

The aim of this study was to investigate the extent of variations in lamotrigine serum concentrations between two immediate-release tablet formulations. Data were compared with *in vitro* difference and similarity tests on dissolution profiles of the two formulations.

METHODS

Dissolution characteristics of formulations A (reference) and B (test) were evaluated at three points spanning the physiologic pH range (pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8). A model-independent approach of difference (*f*₁) and similarity (*f*₂) tests were applied to dissolution data. A clinical study was performed with 16 patients who were divided into two groups – one group received formulation A (n = 9) and the other received formulation B (n = 7). Lamotrigine steady-state concentrations were determined by high-performance liquid chromatography on a reverse-phase column.

RESULTS

There were no statistically significant differences in lamotrigine serum

concentrations between the two groups, although formulation B had slightly higher mean concentration values (formulation A: 3.97 ± 4.1 mg/mL; formulation B: 5.78 ± 2.7 mg/mL). Dissolution profiles of the two formulations were similar in the pH 1.2 dissolution medium; however, the dissolution profiles of formulation B were outside the dissolution limit ($\geq 85\%$ at 15 minutes) in the pH 4.5 and 6.8 dissolution media. The relationship between lamotrigine serum concentration (mg/mL) and lamotrigine dose (mg/kg/day) were linear in both formulations ($r^2 = 0.78484$ formulation A; $r^2 = 0.83417$ formulation B). Formulation A had a lower standard deviation (SD) and data scattering because, as the dissolution data showed, it is less influenced by pH changes. The test formulation, or formulation B, had a higher data scattering and SD, which corresponds with the higher influence of pH changes on the dissolution profile.

CONCLUSIONS

No significant changes in the serum concentrations of lamotrigine were seen between the two investigated formulations. There is no evidence to suggest that the differences in dissolution profiles at pH 4.5 and pH 6.8 affect the therapeutic efficacy of the formulations. It is evident that the doses of test formulation given to the patients were higher as a consequence of common assumption that generic products have a lower absorption rate, which is proven unnecessary in this study. This investigation was a pilot study and thus further investigations with a larger sample size are necessary to determine if there is a connection between dissolution profiles and the therapeutic effect of investigated formulations.

This work has been supported by Ministry of Science and Technology development of Serbia N^o41012.

REFERENCES

1. Besag FMC. Is generic prescribing acceptable in epilepsy? *Drug Safety* 2000; 23: 173-82
2. Kramer G, Biraen A, Carreno M, et al. Current approaches to the use of generic antiepileptic drugs. *Epilepsy Behav* 2007; 11: 46-52
3. Sripalakit P, Srichaiya A, Kande R. Development and validation of a HPLC method for a dissolution test of lamotrigine tablets and its application to drug quality control studies. *J Liquid Chromatography & Related Technologies* 2008; 31: 926-39
4. Lalic M, Cvejic J, Popovic J, et al. Lamotrigine and valproate pharmacokinetics interactions in epileptic patients. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2009; 34 (2): 93-9
5. Lue BM, Nielsen FS, Magnussen T, et al. Using biorelevant dissolution to obtain IVIC of solid dosage forms containing a poorly-soluble model compound. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 69: 648-57

INFLUENCE OF PARTICLE SIZE ON THE DISSOLUTION RATE OF ATORVASTATIN CALCIUM TABLETS

E. Adamova, L. Makraduli, R. Dameska, E. Ristevska, L. Ivceska, H. Litovin, D. Dimova, A. Sekovanic, M. Anevskaa, D. Lepčevska

Replekfarm, Kozle 188, 1000 Skopje, R. Macedonia

INTRODUCTION

Atorvastatin, as a synthetic lipid-lowering agent, is an inhibitor of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase which catalyzes the conversion of HMG-CoA to mevalonate, an early rate-limiting step in cholesterol biosynthesis. According to BCS it belongs to category II - low solubility, high permeability. It is very slightly soluble in water, phosphate buffer with pH=7.4 and in acetonitrile. It's practically insoluble in water solution with pH ≤ 4 . Atorvastatin can exist in an amorphous form and in many crystalline forms (Form I, II, III, IV...) [1]. The bioavailability of atorvastatin is one of the key parameters for its therapeutic use and is dependent on the form of the atorvastatin calcium to be used in the pharmaceutical formulation (amorphous, crystalline or a mixture of both). It is known that the amorphous form in a number of pharmaceutical substances exhibit different stability and dissolution characteristics and bioavailability patterns compared to the crystalline forms. According to the U.S. Food and Drug Administration's (FDA) summary of approval for Warner-Lambert's Lipitor™, originally atorvastatin was synthesized in the amorphous form [2], but this form was reported to be hygroscopic and unstable when exposed to oxygen. Later a more stable crystalline form of atorvastatin was developed by Warner-Lambert. Due to its better stability and faster absorption from the GIT, crystalline atorvastatin is being used in the marketed formulation of atorvastatin [3]. Different physical forms of a drug can affect its absorption. Typically, the crystal or polymorphic form, the state of hydration or solvation, and physical size and shape of drug particles may have considerable impact on the rate and extent of drug absorption. These polymorphs may have different physical properties, such as dissolution rate and solubility. Particle size and particle size distribution may play a major role in dissolution and drug absorption. The effective surface area of the drug is increased enormously by a reduction in the particle size. Smaller particle size enhances water penetration into the particles and increases the dissolution rates [4]. Particle size reduction has been used to increase the absorption by increasing dissolution rates of a large number of poorly soluble drugs [1].

OBJECTIVE

To evaluate the influence of particle size and particle size distribution on the dissolution rate of crystalline atorvastatin calcium in a pharmaceutical formulation - film coated tablet. To recognize the fact that beside the polymorphic form, particle size and particle size distribution is equally important parameter for drugs with low water solubility like atorvastatin calcium.

MATERIALS AND METHODS

API- Atorvastatin Calcium crystalline (Zydus Cadila Healthcare Ltd.); Dissolution test: According to Ph.Eur. 2.9.3; Apparatus 2- Paddle; Medium- phosphate buffer, pH 6.8, 900 ml; Temperature of the medium: $37 \pm 0.5^\circ \text{C}$; Time: 30 minutes; Rotations: 75 rpm;

Specification requirement: Min. 80% (Q + 5%) dissolved Atorvastatin (as Atorvastatin Calcium trihydrate) per film coated tablet, expressed in percent of the declared content. UV Spectrophotometric determination; absorbance wavelength of $242 \pm 2\text{nm}$; Medium-phosphate buffer, pH 6.8 (dissolution medium).

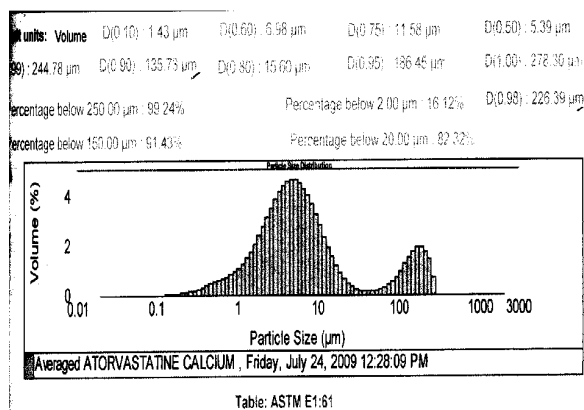
RESULTS

Atorvastatin film coated tablets a 20 mg were produced by wet granulation method with the following composition: Calcium carbonate powder, Lactose monohydrate, Cellulose microcrystalline, Croscarmellose sodium, Povidone, Polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters (Polysorbate 60), Silica colloidal anhydrous, Talc pharma grade, Magnesium stearate, and Opadry white 03F28342. Each batch of the finished product was tested for dissolution. For each batch of the API a Malvern Mastersizer report was provided by the manufacturer.

Table 1 Comparative table of particle size of the crystalline Atorvastatin calcium API with percent dissolution of the film coated tablets

Batch # of API	Particle size by Malvern Mastersizer* D (0.50) μm	Particle size by Malvern Mastersizer* D (0.90) μm	% Dissolution of the finished product
AVK1AKA09B	2 μm	7 μm	90 %
AVK1MJJ85A	3 μm	8 μm	86 %
AC/005/8016	5 μm	14 μm	86%
AVK1AKA45B	11 μm	36 μm	75 %
AVK1BJJ51A	5.39 μm	135.7 μm	71%

*Data provided by the API manufacturer. Each value is a mean of 3 measurements of the lot.



Graph 1 Particle size distribution graph by Malvern Mastersizer of the lot AVK1BJJ51A*

*Data provided by the API manufacturer. The graph is representation of 3 measurements of the lot.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The dissolution rate of atorvastatin calcium film coated tablets depends not only on the particle size but particle size distribution as well. Especially important is the distribution of the particles in the range D(0.50)-D(0.90). The batches of the API with tight distribution D(0.50)-D(0.90) have higher dissolution rates and batches with wide distribution D(0.50)-D(0.90) have lower dissolution rates.

REFERENCES

1. Salam WA., Lupuleasa D.- Enhancement of solubility and dissolution rate of different forms of atorvastatin calcium in direct compression tablet formulas, Farmacia, 2009; 57, 3: 290-300
2. Roth BD., Warner- Lambert Company.- Trans-6-[2-(3- or 4- carboxamido-substituted pyrrol-1-yl) alkyl]-4-hydroxypyran-2-one inhibitors of cholesterol synthesis, United states patent 4,681,893, 1987
3. Briggs CA., et al, Warner- Lambert Company.- Crystalline [R-(R*,R*)]-2- (4-difluorophenyl)- β , δ -dihydroxy-5- (1-methylethyl)-3-phenyl-4-[(phenylamino)carbonyl]-1H-pyrrole-1-heptanoic acid hemi calcium salt (atorvastatin), United states patent 5,969,156, 1999
4. Leon Shargel L., Andrew B.C.Yu; Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 2002 Biopharmaceutics

ВЛИЈАНИЕ НА ГОЛЕМИНАТА НА ЧЕСТИЦИ НА РАСТВОРЛИВОСТА НА АТОРВАСТАТИН КАЛЦИУМ ТАБЛЕТИ

Е. Адамова, Л. Макрадули, Р. Дамеска, Е. Ристевска, Л. Ивческа, Х. Литовин, Д. Димова, А. Секованиќ, М. Аневска, Д. Лепчевска

¹Реплекфарм, Козле 188, 1000 Скопје, Р. Македонија

ВОВЕД

Аторвастатин е синтетски агенс за регулација на липидниот статус, инхибитор на 3-hydroxy-3- methyl-glutaryl-coenzyme A (HMG- CoA) редуктаза која ја катализира конверзијата на HMG-Co A во мевалонат-една од почетните фази во биосинтезата на холестерол. Според BCS припаѓа на категорија II - ниска растворливост, висока пермеабилност. Тој е многу слабо растворлив во вода, во фосфатен пуфер со pH= 7.4 и во ацетонитрил. Во воден раствор (pH \leq 4) практично е нерастворлив. Може да постои во аморфна форма и во повеќе кристални форми (I, II, III, IV...) [1]. Биорасположивоста на аторвастатин-еден од клучните параметри за неговото терапевтско дејство зависи од неговата форма(аморфна, кристала или смеса) употребена во формулацијата. Аморфните форми на некои активни супстанции во однос на кристалните форми покажуваат варијабилна стабилност, биорасположивост и растворливост. Според маркетинг авторизацијата од U.S. FDA за Lipitor™ на Warner-Lambert, аторвастатинот бил почетно синтетизиран во аморфна форма [2]. Во некои испитувања се покажа дека оваа форма е хигроскопна и нестабилна во присуство на кислород. Подоцна во Warner-Lambert е развиена постабилна кристална форма на аторвастатин. Заради подобрата стабилност и подобра абсорпција од ГИТ, во трговската формулација на аторвастатин се користи кристален аторвастатин [3]. Физичките форми на активните супстанции-кристална или полиморфна; степенот на хидратација или солватација; големината, обликот на честиците и дистрибуцијата на честиците според големина имаат значително влијание на растворливоста на активната супстанција и брзината и степенот на абсорпција. Со намалување на големината на честиците

се зголемува ефективната површина на супстанцијата[4]. Со редукција на димензијата на честиците се зголемува абсорпцијата на тешко растворливите супстанции преку зголемување на брзината на растварање [1].

ЦЕЛ

Да се испита влијанието на големината на честиците и нивната дистрибуција според големина врз брзината на растварање на кристален аторвастатин калциум во фармацевтска формулација филм-обложени таблети. Да се испита дали освен полиморфната форма, големината на честиците и нивната дистрибуција се подеднакво значајни параметри за подобрување на растворливоста на тешко растворливи супстанции како аторвастатин калциум.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Аторвастатин калциум трихидрат кристален (Zydis Cadila Healthcare Ltd.); Тест за растворливост: според Ph.Eur. 2.9.3; Апарат 2-весло во фосфатен пуфер со pH= 6.8, 900 ml; за време од 30 мин и број на ротации од 75 рпм.

Спецификација за растворливост: Мин. 80% (Q + 5%) растворен аторвастатин на филм-обложена таблета, како процент од декларираната содржина. UV спектрофотометриско отчитување на 242 ± 2nm во истиот пуфер.

РЕЗУЛТАТИ

Аторвастатин филм- обложени таблети од 20 мг со состав: Calcium carbonate powder, Lactose monohydrate, Cellulose microcrystalline, Croscarmellose sodium, Povidone, Polyoxethylene sorbitan fatty acid esters (Polysorbate 60), Silica colloidal anhydrous, Talc pharma grade, Magnesium stearate, and Opadry white 03F28342 се изработени со влажна гранулација. Тестирана е растворливоста на секоја произведена серија на готов производ.

Табела 1 Компаративна табела на големина на честици на кристална активна супстанција Аторвастатин калциум и растворливост на филм- обложени таблети

* Податоци добиени од производителот на активната супстанција.

Серија на активна супстанција	Големина на честици според Malvern Mastersizer* D (0.50) ≤	Големина на честици според Malvern Mastersizer* D (0.90) ≤	Растворливост на готов производ (%)
AVK1AKA09B	2 µm	7 µm	90 %
AVK1MJJ85A	3 µm	8 µm	86 %
AC/005/8016	5 µm	14 µm	86%
AVK1AKA45B	11 µm	36 µm	75 %
AVK1BJJ51A	5.39 µm	135.7 µm	71%

Секоја вредност е просек од 3 мерења.

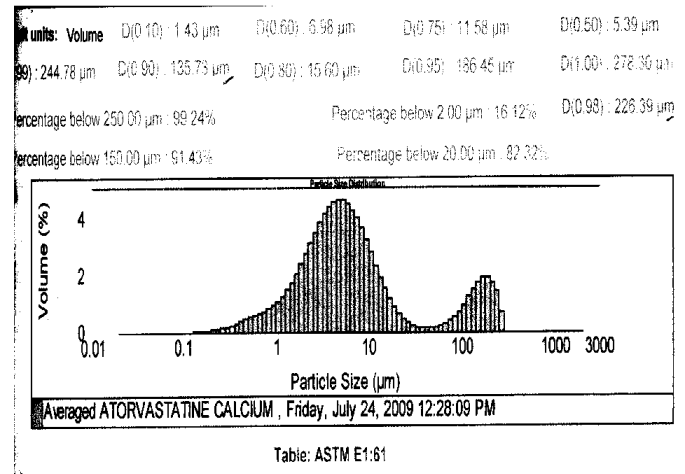


График 1 График на дистрибуција на честици по големина (мерено со Malvern Mastersizer) на серија AVK1BJJ51A

ЗАКЛУЧОК

Брзината на растворливост на аторвастатин филм-обложени таблети зависи не само од големината на честици туку и од нивната дистрибуција според големина. Особено е значајна дистрибуцијата на честици во опсегот D(0.50)-D(0.90). Сериите на активна супстанција со тесна дистрибуција D(0.50)-D(0.90) имаат подобра растворливост, а сериите со широка дистрибуција D(0.50)-D(0.90) имаат пониска растворливост.

ЛИТЕРАТУРА

1. Salam WA., Lupuleasa D.- Enhancement of solubility and dissolution rate of different forms of atorvastatin calcium in direct compression tablet formulas, Farmacia, 2009; 57, 3: 290-300
2. Roth BD., Warner- Lambert Company.- Trans-6-[2-(3- or 4- carboxamido-substituted pyrrol-1-yl) alkyl]-4-hydroxypyran-2-one inhibitors of cholesterol synthesis, United states patent 4,681,893, 1987
3. Briggs CA., et al, Warner- Lambert Company.- Crystalline [R-(R*,R*)]-2-(4-difluorophenyl)-2,2-dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-phenyl-4-[(phenylamino)carbonyl]-1H-pyrrole-1-heptanoic acid hemi calcium salt (atorvastatin), United states patent 5,969,156, 1999
4. Leon Shargel L., Andrew B.C.Yu; Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 2002 Biopharmaceutics

FORMULATION OF GASTRO-RESISTANT TABLETS WITH EUDRAGIT®

Sonja Dimchevska, Pačka Antovska, Bosilka Stefanova, Sonja Ugarkovic

Research and Development, ALKALOID AD, Aleksandar Makedonski 12, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

Polymethacrylates (known under the name Eudragit®), are excipients with different usage in the pharmaceutical industry. Their primary use is in the film-coating of solid dosage forms as film-coating polymers with specific characteristics. Depending on the type of polymer used, films of different solubility characteristics can be produced. Also, polymethacrylates are used in sustained release formulations, in taste masking coatings, protective coatings for active substances sensitive to humidity, oxygen and light. Still, most frequently polymethacrylates are used in functional coatings for targeted release of drugs in the gastro-intestinal tract (small intestine or colon)^{1,2}.

SCOPE

To formulate gastro-resistant tablets which contain active substance for local action in the colon with Eudragit as film-forming polymer. The key to controlling the release of the drug is the pH-dependent dissolution of the polymer in the film coating, which enables drug release in specific section of the gastro-intestinal tract¹. Since it is necessary the polymer to dissolve when the tablet reaches the colon where pH is around 7, the most suitable for this purpose is poly(methyl acrylate, methyl methacrylate, methacrylic acid), which is commercially available as 30% water dispersion.

MATERIALS AND METHODS

Water dispersion of polymethacrylates, Triethyl citrate, Glycerol monostearate, Polysorbate 80, pigment iron oxide yellow, Emulsion simeticone 30%, Talc, Opadry clear.

During the film-coating process, polymethacrylates become sticky (tacky) and rubbery and there is possibility of agglomeration while processing. Therefore, addition of anti-tacking agents is necessary to minimize this sticking tendency (talc, glycerol monostearate)¹. During the formulation of the suspension for film-coating with Eudragit, the accent was on overcoming the stickiness of the Eudragit and enabling good and stable coating process. For that purpose, different formulations of the Eudragit suspension were made which had different anti-tacking agents in different concentrations.

	Anti-tacking agent	Concentration (%w/w) calculated on dry polymer substance
Formulation 1	Talc	50 %
Formulation 2	Glycerol monostearate	5 %
Formulation 3	Glycerol monostearate	10 %

Film-coating was performed in conventional pan for film-coating. The formulation with talc was rejected due to its sedimentation in the coating suspension and decreased flow through the spray nozzle. Formulations with glycerol monostearate enabled good process of film-coating without sticking and agglomeration of tablets. The film-coated gastro-resistant tablets (formulation 2 and 3) complied with the pharmacopoeial test for disintegration of this type of tablets: tablets must not disintegrate in 0.1M HCl for 2 hours and should disintegrate in 1.5 %w/v solution of sodium hydrogen carbonate for one hour³. However, in-bulk storage of the film-coated tablets at room temperature for couple of weeks, showed agglomeration of tablets with formulation 2, which was not the case with the tablets with bigger concentration of glycerol monostearate as anti-tacking agent (Formulation 3). Still, for providing better insurance that the coated tablets will not stick to the blister nests during the product's shelf life, gastro-resistant tablets were further coated with another protective layer of film based on hydroxypropyl methylcellulose (Opadry clear).

CONCLUSION

Film-coated tablets with formulation 3 (10%w/w glycerol monostearate calculated on dry polymer substance) and additional protective film-layer of Opadry clear showed good results. Tablets in blister packaging didn't show sticking tendency of the film-coating to blister nests, which indicates on appropriate selection of the type and concentration of the anti-tacking agent.

REFERENCES

1. Eudragit® Application Guidelines, 11th edition, september 2009, Evonik Industries
2. R.C. Rowe, P. J. Sheskey, S. C. Owen, The Handbook of Pharmaceutical Excipients, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association (2006)
3. British Pharmacopoeia 2011

ФОРМУЛАЦИЈА НА ГАСТРО-РЕЗИСТЕНТНИ ТАБЛЕТИ СО EUDRAGIT®

Соња Димчевска, Пацка Антовска, Босилка Стефанова, Соња Угарковиќ

Истражување и развој, АЛКАЛОИД АД, Александар Македонски 12, 1000 Скопје, Република Македонија

Полиметакрилатните полимери (познати под името Eudragit®) се ексципиенти кои наоѓаат различна примена во фармацевтската индустрија. Нивната најчеста примена е во обложувањето на цврсти дозирани форми како филм-образувачки полимери со специфични карактеристики. Зависно од типот на полимер, се добиваат филм-обвивки со различна растворливост. Исто така, полиметакрилатите се користат и во формулации со продолжено ослободување, за маскирање на непријатен вкус и мирис, како заштитни филмови кај активни супстанции осетливи на влага, кислород и светлина. Сепак, најчесто полиметакрилатите се користат како функционални филмови за таргетирано ослободување во гастро-интестиналниот тракт (тенкото црево или колонот)^{1,2}.

ЦЕЛ

Да се формулира гастро-резистентна таблета со активна супстанција наменета за локално дејство во колонот со употреба на Eudragit како филм-образувачки полимер. Клучот во контролирање на

ослободувањето на активната супстанција е рН зависната растворливост на полимерот во филм-обвивката, што овозможува ослободување на активната супстанција на точно одредено место во дигестивниот тракт¹. Бидејќи е потребно полимерот да се раствори дури откако таблетата ќе пристигне во колонот каде што рН е околу 7, како најсоодветен полимер за оваа намена што се раствора на рН \geq 7 е poly(methyl acrylate, methyl methacrylate, methacrylic acid), кој комерцијално е достапен во вид на 30% водена дисперзија.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Водена дисперзија на полиметакрилати, Triethyl citrate, Glycerol monostearate, Polysorbate 80, Жолт железен оксид, Емулзија симетикон 30%, Talc, Opadry clear.

При процесот на филм-обложување, полиметакрилатите стануваат лепливи и постои можност од агрегација при процесирањето. Заради тоа е неопходно додавање на средства кои ќе ја намалат тенденцијата кон лепење (талк, глицерол моностеарат)¹. При формулацијата на суспензијата за филм-обложување со Eudragit, акцент беше ставен кон надминување на лепливоста на Eudragit и овозможување на добар тек на процесот на филм-обложување. За таа цел беа направени проби со различни средства против лепење и во различни концентрации:

Средство против лепење Концентрација во однос на сувиот полиметакрилатен полимер (%w/w) Формулација 1 Talc 50 % Формулација 2 Glycerol monostearate 5 % Формулација 3 Glycerol monostearate 10 %

	Средство против лепење	Концентрација во однос на сувиот полиметакрилатен полимер (%w/w)
Формулација 1	Talc	50 %
Формулација 2	Glycerol monostearate	5 %
Формулација 3	Glycerol monostearate	10 %

Филм-обложувањето беше направено во конвенционален барабан за обложување. Формулацијата со талк беше отфрлена заради таложење на талкот од суспензијата за филмување и намален проток на суспензијата низ спреј-млазницата. Формулациите со глицерол моностеарат овозможуваат добар тек на процесот на филм-обложување без лепење и агрегација на таблетите. Добиените гастро-резистентни таблети (формулација 2 и 3) одговараа на фармакопејското барање за дезинтеграција на овој тип таблети: таблетите не смеа да се распадат во 0.1M HCl за време од 2 часа, а треба да се распадат во 1.5 %w/v раствор на натриум хидроген карбонат за време од еден час³. Меѓутоа, при чувањето на филм-обложените таблети in-bulk на собна температура, после неколку недели се забележа агрегација на таблетите кај формулацијата 2, што не беше случај кај таблетите со поголема концентрација на глицерол моностеарат како средство против лепење (формулација 3). Сепак, заради обезбедување на уште поголема сигурност дека во тек на рокот на употреба на филм-обложените таблети со Eudragit нема да се појави лепење на филм-обвивката за гнездата на

блистер-пакувањето, таблетите беа дополнително обложени со уште еден слој на заштитен филм со хидроксипропилметил целулоза (Opadry clear).

ЗАКЛУЧОК

Филм-обложените таблети со формулација 3 (со 10%w/w глицерол моностеарат во однос на сувиот полиметакрилатен полимер) и дополнителен заштитен филм со Opadry clear покажаа добри резултати. Таблетите спакувани во блистер пакување не покажаа тенденција кон лепење на филм-обвивката за гнездата, што укажува на правилен избор на типот и концентрацијата на средството против лепење.

ЛИТЕРАТУРА

1. Eudragit® Application Guidelines, 11th edition, september 2009, Evonik Industries
2. R.C. Rowe, P. J. Sheskey, S. C. Owen, The Handbook of Pharmaceutical Excipients, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association (2006)
3. British Pharmacopoeia 2011

EVIDENCE BASED HOMEOPATHY-SCIENTIFIC FRAMEWORK OF HOMEOPATHY DRUGS PREPARATIONS IN HOMEOPATHIC MATERIA MEDICA

Vesna Simonova, Dora Pachova
Center for Health and Education "EDICTA", Sofia, Bulgaria

INTRODUCTION

Homoeopathy is a system of medicine founded by the celebrated physician Dr. Samuel Hahnemann (1755-1843) of Germany. It is based on the principle that "like cures like". In practice, this means that a medicine capable of producing certain effects when taken by a healthy human being is capable of curing any illness that displays similar effects.¹ Skilled homeopathic prescribing requires that the characteristics of the chosen medicine should be as similar as possible to the characteristics of the illness in the patient. Thus, homeopathy is highly individualized and based upon a holistic assessment. Medical philosophy is coming more and more to the conclusion that the mere treatment of symptoms and organs can only help temporarily and that it is the healing power of the body as a whole that has to be enhanced.² Vitality makes an individual alive and sustain. Fuelled and animated by the bio-energy, the biological entity represents its own pattern of energy. Disease is nothing but a disruption of the biological rhythm and it represents a deviant biological energy with respect to form, function and structure. Cure is restoring, rectifying, and modifying the deviated diseased energy through perceiving.³

OBJECTIVES

Drug is a substance that changes the biological system by interacting with it. When a drug is introduced in our body it causes physiological and biological changes in it. The conventional pharmacy drug act with chemical and biological mode of action, but in homeopathy it is energetic mode of action. The objective of this paper is exploring the scientific framework of homeopathy remedies preparations in Homeopathic Materia Medica. Materia Medica is the branch of medical science concerned with the

study of drugs and their properties, preparation, and their mode of action, including: knowledge of sources of drugs; knowledge of mode of collection of drug, substance and their method of preservation, knowledge of preparation of drugs, potentization; knowledge of vehicles, knowledge of posology; knowledge of pharmacology; knowledge of drug proving; knowledge of standardization; knowledge of prescription writing and new researches.⁶

Preparation: Homeopathic drug has specific energetic pattern of action, different from classical drugs used in the modern medicine. This is so because of specific mode of preparation called potentization. The process of potentization which is a step by step dilution and succussion (jerking) of the drug makes it extremely powerful and at the same time renders it harmless. Potencies employed by the homoeopath are from mother tincture to the 100.000th potencies.¹ Various techniques have been employed to demonstrate that there are physical differences between potentized dilutions and the solvent. These studies have included the use of ultra violet spectra, conductivity and infra red analysis, surface tension measurement, nuclear magnetic resonance, spectroscopy and other.⁷ There are some hypotheses for homeopathic micro diluted remedies which explain the specific organization of molecules of the solvent in homeopathic microdilutions which can maintain the properties of an initial substance not effectively present in the solution. The hypothesis assume that during the first dilutions, clusters are formed which are aggregates of a small number of molecules of the substance. They are surrounded by shells of organized hydrogen-bonded molecules of the solvent (called clathrates). Because of the applied forceful succussions, small clusters move out of their clathrates. A new clathrate then forms around each relocated cluster and an additional clathrate is formed.⁴ A new magnetic resonance method has been developed for measuring homeopathic potencies. There has been detected magnetic photons in homeopathic potencies. Magnetic resonance method where various high-potentized homeopathic remedies were put in a strong magnetic field and were found to resonate differently - each remedy with its own magnetic resonance. Homeopathic photons are bound to their carrier molecule, either water or sugar, by their magnetic poles. When shaking up a remedy, water structure change is caused by various types of photons with their specific frequencies and by their energy when they are bound to the magnetic pole of water. Because photons are magnetically bound with their characteristic properties, homeopathic remedies contain "information." This information is the homeopathic magnetic photon with its intrinsic electromagnetic wave packet and different frequencies transformed by the preparation ways (succussion) into higher frequencies at higher potencies. In general each homeopathic potency contains a distinct energy level. The highest energy is found in the potencies that have been shaken-and-diluted the most. Healing by homeopathy is achieved by a regulation of the electromagnetic field according to the principle of resonance. Each remedy carries its own resonance pattern. Their electromagnetic properties are proved by a newly developed magnetic resonance method, using two different Tesla coils which generate longitudinal waves at distinct resonance frequencies in the HF range. When laid into the maximum of the magnetic field, homeopathic high potencies with frequencies being in resonance with those of the coils attenuated the magnetic field. Therefore, it can be concluded that homeopathic potencies consist of magnetic photons. For the first time, the degree of each potency could be measured and characterized by its specific μV input level which separated the photons from their carrier molecule of sugar at their resonance frequency. Homeopathic potencies are magnetic photons with several frequencies in the HF range and with different energies.⁵

Provings: The homeopathic remedies that are used are tested on human volunteers (provers) to elicit the symptoms they can produce. The symptoms of each remedy as experienced by the provers are recorded in exact detail and they form the homoeopathic *Materia Medica*. Proving is a method with strictly described procedure and is conducted by prepared and trained people. All safety rules are considered – no harm for the provers.

Doctrine of signature: In Homeopathy, the relation between the drug source and drug symptoms is known as doctrine of signature.

CONCLUSION

Because of the specific methods of preparation and action, homeopathic remedies create no side-effects and do not induce therapy resistance. Homeopathy is safe for pregnant women, babies and elderly people. Production, storage and distribution of homeopathic remedies are simple. University research on homeopathy must be encouraged, stimulated and supported by the public health authorities.

REFERENCES

1. Sankaran R., *The Spirit of Homeopathy*, Second edition, 1992
2. Homeopathic care in a medical context, European Committee for Homeopathy (ECH), www.homeopathyeurope.org
3. Medical history for homeopathic treatment, Dr. Ajit Kulkarni
4. The working hypothesis for homeopathic microdiluted remedies, G.S.Anagnostatos, Demokritos National Research Center for Physical Sciences, Athens, Greece; G.Vithoulkas, C.Tavouxioglou, Homeopathic Medical Center, Athens, Greece; P.Garzonis, Chest Disease Hospital, Athens, Greece
5. Homeopathic Potencies Identified By A New Magnetic Resonance Method: Homeopathy—An Energetic Medicine, Dr. Karin Lenger
6. Evidence based homeopathy November 2010, Liga Medicorum Homeopathica Internationalis and of the European Committee for Homeopathy
7. A hypothesis on the nature of Homeopathic Potencies, Kumar A. Jussal, *British Homeopathic Journal* 68: 197-204, 1979
8. Modern Instrumentation for the Evaluation of Homeopathic Drug Structure, Smith R.B., Boericke G.V., *Journal of the American Institute of Homeopathy* 59: 263-280, 1966
9. Nuclear Magnetic Resonance Studies of Succussed Solutions, Young, T.M., *Journal of the American Institute of Homeopathy* 68: 8-16, 1975
10. Dielectric Strength Testing of Homeopathic Dilutions of HgCl₂, Brucato A., Stephenson J, *Journal of the American Institute of Homeopathy* 59: 281-286, 1966

SUPPLIER QUALIFICATION – APPROACH THROUGH RISK ASSESSMENT

Snezana Vecerkov Vukmirovic

Alkaloid doo Belgrade

INTRODUCTION

Producers of generic medicines who implement their strategy through the development and strengthening of operational management, have reinforced their competitive advantages on superior relationships with their suppliers. European directives implemented into national legislation and collected into Guidelines - Good Manufacturing Practice, have defined the expectations based on economic justification of the supplier qualification, primarily from the reduction of overall expenses standpoint. Clearly delineated program of supplier audit together with appropriate selection strategy shall, by implementing the ICH Q9 and application of risk assessment tools, effectively support the quality management system by acquiring return information to system design and realization of supplier qualification.

SCOPE

When pharmaceutical industry contemplates a vendor, the first notion pops up of suppliers of starting and packaging materials that are used in the manufacture of medicinal products, but also of vendors supplying equipment, software, hardware, contract manufacturers, contract laboratories, as well as those supplying services, such as warehousing and distribution, calibration, environmental condition monitoring, and HR agencies. Consequently, it becomes obvious that the purpose of **supplier qualification** is the way to secure an appropriate level of confidence that such a supplier/vendor will consistently deliver substances, materials, equipment, and services of adequate quality, and in line with regulatory requirements and client expectations. Quite reasonably, a **cost-effectiveness analysis** of services to be rendered and observance of deadlines shall be included in such qualification so that client company business plans may have realization as expected and be generally accomplished through Quality Management System (QMS) implementing Quality Risk Management (QRM) analysis.

METHOD

Pharmaceutical industry and regulatory authorities have the risk evaluated and processed by multiple different empirical methods based on identification and compilation of observations and trends providing useful deviation- and QMS-deficiency-related information. Quality Risk Management (QRS) should be recognized as an efficient method of evaluation, control, communication and critical assessment of the risk impact on the medicinal product quality throughout the life cycle of such product. Although a systematic approach is usually favored, the implementation of informal procedures in the risk management is quite acceptable, as well. In case of practical supplier qualification approach the risk analysis process embraces a two-way consideration, namely:

What such risk analysis means to the company?

How shall such risk analysis procedure be applied to supplier qualification?

This paper responds to the issues relying on two methods:

Systematization of theoretical concept of risk management in the process of starting material delivery and finished product manufacture.
Analysis of risk management in the Alkaloid doo Belgrade supply chain.

Results

Supplier evaluation activities and the management of supplier qualification process itself is accomplished through the process of document and action creation, analysis and tracking through systematic processing of data collected by, e.g. questionnaires, monitoring lists, audits, third party inspections, quality history tracking, presence/absence of QMS certificates/ licenses, etc. The supplier ranking by risk identification and consideration given to potential suppliers' impact on patient safety, product quality and efficacy, personnel safety and regulatory requirement, helped identify the three levels of possible risk the company may be facing, namely:

» **high-risk supplier**, direct impact: contract laboratories and supplier of software generating the product release data;

» **medium-risk supplier**, indirect impact: API and excipient suppliers, suppliers of primary packaging material, intermediate(s), printed packaging material, warehousing and distribution service suppliers, consultants contributing to report generating, software sub-system providers;

» **low-risk supplier**, with no direct impact: providers of non-GXP services, secondary packaging material suppliers.

As supplier-qualification tool, a questionnaire design depends on who

we are intending to qualify – a new supplier or the existing one. Any new supplier shall provide complete answers, well documented, with emphasis on the supplier's QMS, company size and sites, certificates/licenses held, reference list, organization flow-chart, and history of audits / inspections. An already established supplier, deliver information on all the process/product modifications, changes in corporate structure and distribution of responsibilities, complaints and recalls, production volume, certificates held, and history of regulatory inspections. By continuous monitoring of such supplier and its deliveries made over the 12-month period, namely through the volume of services rendered, presence/ absence of complaints, withdrawals/recalls, returned goods, quality of shipments (shipments are delayed, or incomplete, mixed up, or inappropriately labelled), tracking of the realization of corrective measures required, and production/ product/ facility, equipment modifications, such supplies becomes classified as either:

» **high-risk supplier**

audit frequency every 2 years, or

» **medium-risk supplier,**

to be audited every 3 years, or

» **low-risk supplier**

regularly audited every 4 years

The **Risk Management System** established, implemented in the supplier qualification process as an integral part of Alkaloid doo Belgrade QMS, contributed to the following:

- » all processes are specified and well documented;
- » faster decision making;
- » responsibilities are clear and unambiguous;
- » potential risk is identified before it becomes critical;
- » activities on audit preparation and execution are less, more specific;
- » reduced costs, both direct and indirect.

CONCLUSION

Generic pharmaceutical companies build their strategy and market position on the partnerships with supplier, where the best supplier for the company is the one which generates the least costs, and not necessarily the one whose prices are the lowest. The expectations of regulatory authorities are clear, the company QMS must clearly defined supplier qualification program. In Alkaloid doo Belgrade approach to the supplier audit program is based on the risk identification and considering product quality, production, processes and production facilities of the supplier into account. Risk analysis as a tool of audit planning and execution helped specify the audit frequency, systems to be audited, as well as identification of audit priorities. Clearly set audit program has met the management expectations and, by the implementation of risk analysis tools, effectively supported the company QMS, providing evidence to regulatory authorities that Alkaloid doo Belgrade has competence to manage potential market-generated risks effectively.

REFERENCES

1. ICH Q9, „Quality risk management“, 2005
2. S. Vecerkov Vukmirovic, „Pristup kroz analizu rizika – alat za efikasnu kvalifikaciju dobavljača“, „TQM & Excellence“, Vol. 35, No. 1 - 2, 2007, YUSQ ICQ 2007.

PREFORMULATION STUDIES OF ZOLPIDEM TABLETS

Pačka Antovska, Gjorgji Petruševski,
Sonja Dimčevska, Bosilka Stefanova,
Sonja Ugarković

Research and Development, ALKALOID AD, Aleksandar Makedonski 12,
1000 Skopje, Republic of Macedonia

Solid-state compatibility studies of the compounds proposed for development of new pharmaceutical formulations, as well as the screening of the particle size distribution and the morphology of the active ingredient, is one of the first steps undertaken in the preformulation studies¹.

In order to examine the solid-state compatibility between the active pharmaceutical ingredient (API) zolpidem tartrate and the excipients (lactose monohydrate, cellulose microcrystalline, sodium starch glycolate, hypromellose, magnesium stearate)^{2,3} proposed for the development of the formulation Zolpidem film coated tablets, produced by ALKALIOD AD-Skopje, Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy research was employed.

AIM

The aim of this experiment was to characterize the API as well as to investigate possible solid-state interactions between zolpidem tartrate and the described excipients, based on the induced changes in the infrared spectra of the stressed binary mixtures compared to the infrared spectra of the pure compounds and initial binary mixture, as consequence of possible solid-state chemical reaction.

MATERIALS AND METHODS

The FT-IR spectra were recorded in the region 500–4000 cm⁻¹, using KBr pellets method at ambient temperature with Varian 660 FT-IR spectrometer. Particle size distribution and morphology was determined on Morphologi-G3S, automated particle size and morphology analyzer, Malvern Instruments.

Two sets of binary mixtures were prepared by mixing the API with each excipient in ratio 1:1 (w/w)⁴. The first set was prepared by mixing of zolpidem tartrate and each excipient, followed by wet granulation with purified water, sizing on 2 mm rasp-screen and drying until specified LOD (2-4%) was obtained. Dried granulate was sized on 0.63 mm sieve. Second set of binary mixtures was prepared by dry mixing of zolpidem tartrate and excipients. Dry mixtures were passed through 0.63 mm sieve also.

One portion of the binary mixtures was separated and analyzed immediately after the preparation. The obtained FT-IR spectra of this sample (further in the text labelled as PM – Physical Mixture) were later used as a reference spectrum for making correlations with the spectra of the samples kept on different temperature/humidity conditions.

The other portion was packed on Omar blistering machine (mod. Fantasy standard), in standard package (PVC/Al blister and card box) and left for one month, at stability testing chamber with 30°C/65% relative humidity (further in the text labelled as SM1-Stressed Mixture 1) and 40°C/75% relative humidity (further in the text labelled as SM2-Stressed Mixture 2).

CONCLUSIONS

The particles of the API are of irregular shape, having wide range of different forms (Fig. 1). Slight tendencies for agglomeration were observed, even when the sample is dispersed at high pressures.

Figure 1. Micrograph of the dispersion field of the API obtained with the integrated light microscope on Morphologi-G3 using 20X optical magnification.

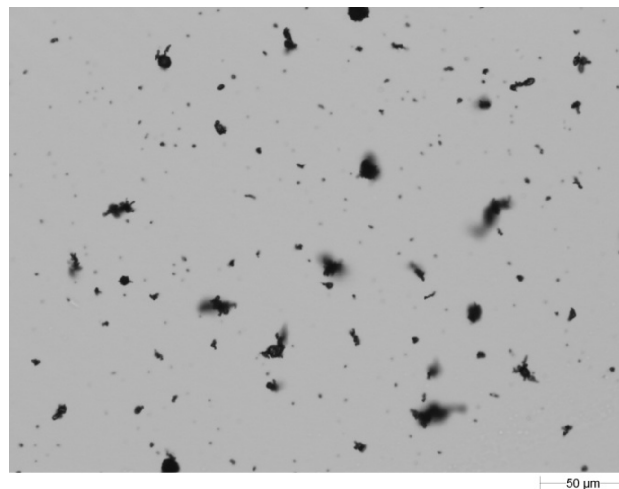


Table 1. Particle size distribution ranges of zolpidem tartrate:

Batch No/Results	D[V,0.1]/μm	D[V,0.5]/μm	D[V,0.9]/μm
110637	8.95	24.14	47.45
118706	10.28	35.82	79.29

Based on the comparison of the FT-IR spectra (of the pure API and excipients with the prepared binary mixtures (PM), it can be concluded that in all cases the most prominent vibrational bands of the API can be identified. Although, generally being obscured and overlapped by the strong bands of the API, few stronger bands originating from the present excipient can be identified in some of the mixture. No additional bands, of unknown origin, were observed. The unchanged positions of the bands of the API in the FT-IR spectrum of the prepared PM, compared to the FT-IR spectrum of the pure API, confirms the overhaul solid state stability of the prepared PM.

Based on the comparison of the FT-IR spectra of the PM (physical mixture, obtained by dry mixing) and the stressed samples (SM1 and SM2), of all prepared binary mixtures, it can be concluded that no significant spectral changes were observed. Only, minor spectral changes, in the samples stored at higher temperature/moisture levels were observed, associated with changes of the stretching (above 3000 cm⁻¹) and bending (~1630 cm⁻¹) H–O–H vibrations, originating from the water/moisture molecules.

Therefore, the FT-IR spectroscopy screening of the PM and SM of Zolpidem tartrate and the proposed excipients, leads to conclusion that they represent only a mechanical mixtures and it proved the overhaul solid-state stability of these samples (prepared and packed using the same technological procedure as for the real production process of the corresponding formulation). Further on, it was proved that there are no difference between the FT-IR spectra of the samples

prepared by dry mixing and wet granulation, both being suitable for implementing in the technological process.

REFERENCES

1. A. S. Narang, V. M. Rao, K. S. Raghavan, Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice, Elsevier Inc, 2009.
2. British Pharmacopoeia 7.1 (2011)
3. R.C. Rowe, P. J. Sheskey, S. C. Owen, The Handbook of Pharmaceutical Excipients, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association (2006)
4. M. S.S. Cunha-Filho, R. Martinez-Pacehco, M. Landin, J. Pharm. Biomed. Anal. 45 (2007) 590–598.

ПРЕД-ФОРМУЛАЦИОНИ СТУДИИ КАЈ ЗОЛПИДЕМ ТАБЛЕТИ

Пацка Антовска, Ѓорѓи Петрушевски, Соња Димчевска, Босилка Стефанова, Соња Угарковиќ

Истражување и развој, АЛКАЛОИД АД, Александар Македонски 12, 1000 Скопје, Република Македонија

Компатибилноста помеѓу ексципиентите и активната супстанција во цврста состојба, предвидени за развој на нова фармацевтска формулација, како и одредувањето на дистрибуција по големина на честици и морфологијата на активната супстанција е еден од првите чекори во пред-формулационите испитувања¹.

Компатибилноста помеѓу активната супстанција (АПИ) золпидем тартарат и ексципиентите (лактоза монохидрат, микрокристална целулоза, натриум скробенгликолат, хипромелоза, магнезиум стеарат)^{2,3} предвидени за развој на формулација на Золпидем филм-обложени таблети, произведени од АЛКАЛОИД АД-Скопје, беше евалуирана со Фурие трансформна инфрацрвена (ФТ-ИР) спектроскопија.

ЦЕЛ

Целта на овој експеримент е карактеризација на АПИ и испитување на потенцијалната интеракција во цврста состојба помеѓу золпидем тартарат и опишаните ексципиенти, базирана на евентуални промени во инфра-црвениот спектар на бинарните мешавини кои се изложени на стрес-услови во споредба со инфра-црвените спектри на чисти ексципиенти и иницијалните бинарни мешавини, како последица на можна хемиска интеракција во цврста состојба.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

ФТ-ИР спектарот е снимен во регионот 500–4000 cm⁻¹, со употреба на метод на KBr таблети, на собна температура на Varian 660 FT-IR спектрофотометар. Дистрибуцијата по големина на честици и морфологијата на честиците се одредени со Morphologi-G3S, опрема за автоматско одредување на големина на честици и морфологија, Malvern.

Припремени се два сета на бинарни мешавини кои се припремени со мешање на активната супстанција со секој ексципиент во сооднос 1:1 (w/w)⁴. Првиот сет е подготвен со мешање на золпидем тартарат со секој ексципиент, проследен со влажна гранулација со прочистена вода, сеене на 2 mm, ренде-сито и сушење до специфицирана влага (2–4%). Сувите мешавини се поминуваат на сито 0.63 mm.

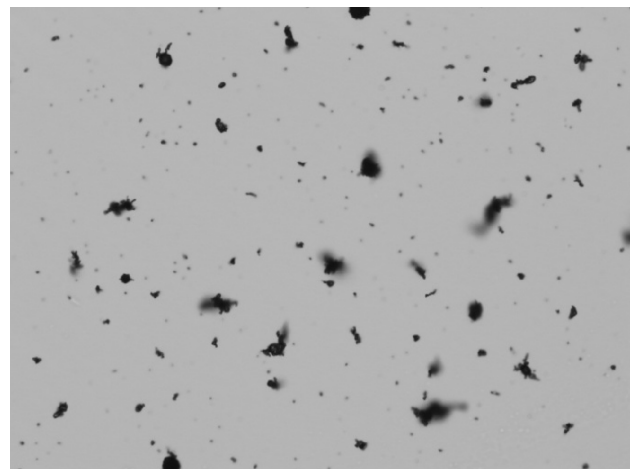
Еден дел од мешавините се анализира веднаш по приготвувањето и добиените ФТ-ИР спектри се означуваат како физички мешавини (понатаму во текстот означени со ФМ) кои подоцна се користат како

референтни спектри за правење корелации со спектрите добиени од мешавините чувани на услови на различна температура/ влажност. Другиот дел е спакуван на Омар опрема за блистер пакување (модел Fantasy standard), во стандардно пакување (PVC/Al блистер и картонска амбалажа) и се поставува еден месец во комора за стабилност на следните услови: 30°C/65% релативна влажност (понатаму во текстот означени со CM1) и 40°C/75% релативна влажност (понатаму во текстот означени со CM2).

ЗАКЛУЧОК

Честичките на активната супстанција се со неправилна форма и покажуваат широк дијапазон на различни форми (Слика 1). Забележана е слаба тенденција за агрегација на честичките, дури и кога примерокот е диспергиран на високи притисоци.

Слика 1. Микрофотографија на дисперзионо поле на активната супстанција добиено со интегриран светлосен микроскоп на Morphologi-G3 со употреба на 20X оптичко зголемување



Табела 1. Дистрибуција по големина на честици на золпидем тартарат

Врз основа на споредбата на ФТ-ИР спектрите (на чиста активна супстанција и ексципиентите со подготвените бинарни мешавини

Серија бр./резултат	D[V;0.1]/µm	D[V;0.5]/µm	D[V;0.9]/µm
110637	8.95	24.14	47.45
118706	10.28	35.82	79.29

(ФМ)), може да се заклучи дека во сите случаи доминираат лентите на активната супстанција. Иако, генерално се забележуваат и доминираат силните ленти од активната супстанција, може да се идентификуваат неколку силни ленти кои потекнуваат од ексципиентите присутни во мешавините. Не се забележани дополнителни ленти од непознато потекло. Непроменетите позиции на лентите на активната супстанција во ФТ-ИР спектрите на физичките мешавини, во споредба со ФТ-ИР спектрите на активната супстанција, ја потврдуваат стабилноста на физичките мешавини. Врз основа на споредбите на ФТ-ИР спектрите на физичките мешавини (добиени со суво мешање) и примероците чувани во коморите за стабилност (CM1 и CM2) на сите подготвени бинарни мешавини, може да се заклучи дека нема забележителни спектрални промени.

промени.

Детектирани се само минорни спектрални промени во примероците чувани на повисока температура/ влажност кои се манифестираат со промени во валентните (над 3000 cm^{-1}) и деформационите (1630 cm^{-1}) Н-О-Н вибрации, кои потекнуваат од молекулите на водата/ влагата присутна во системите.

ФТ-ИР спектроскопијата на на ФМ и СМ на Золпидем тартарат и предложените ексципиенти, води до заклучок дека тие преставуваат само механички мешавини и ја потврдува стабилноста во цврста состојба на овие примероци (подготвени и спакувани со употреба на ист технолошки процес како и во производство на избраната формулација). Истотака, се докажа и дека нема разлика помеѓу ФТ-ИР спектрите на примероците подготвени со суво мешање и влажна гранулација, што укажува на фактот дека и двете технологии се погодни за имплементирање во технолошки процес.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. S. Narang, V. M. Rao, K. S. Raghavan, Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice, Elsevier Inc, 2009.
2. British Pharmacopoeia 7.1 (2011)
3. R.C. Rowe, P. J. Sheskey, S. C. Owen, The Handbook of Pharmaceutical Excipients, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association (2006)
4. M. S.S. Cunha-Filho, R. Martinez-Paceho, M. Landin, J. Pharm. Biomed. Anal. 45 (2007) 590-598.

INFLUENCE OF DIFFERENT LACTOSE MONOHYDRATE SUPPLIER ON IN-PROCESS PARAMETERS ON TABLETS PRODUCED ON A ROTARY TABLET PRESS

Dejan Kostovski, Krume Toshev, Liljana Krsteska, Sonja Ugarkovic

Research and Development, ALKALOID AD, Aleksandar Makedonski 12, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

INTRODUCTION AND AIM

Direct compression is the preferred method for preparation of tablets. One of the most widely used excipients in direct compression, Lactose monohydrate comes in different grades and commercial brands. Experience has shown that variations from established in-process control acceptance criteria and even from product's specification can occur due to changes in supplier. This study evaluates the influence of different Lactose monohydrate supplier on in-process parameters on tablets, produced on a rotary tablet press. The aim is comparison of the information obtained in order to identify similarities and /or differences in-between.

METHODOLOGY

The study was performed in Research and Development facility at Alkaloid-AD, Skopje. Lactose monohydrate was acquired as SpheroLac 100 (Meggler AG, Wasserburg, Germany) and Pharmatose 100M (DMV-Fonterra Excipients GmbH & Co. KG, Goch, Germany). For the purpose, two mixtures of Lactose monohydrate grade 100 and 0.5% Magnesium stearate were prepared and blended in Drum Hoop Mixer. Each mixture was made from different Lactose monohydrate source. The blend was then compressed into tablets with an average mass of 100 mg

using 7 mm flat punches, mounted on a rotary tablet press Korsch XL 100 Pro, equipped with **PharmaControl®**. Alterations were made on the compression force, at maximum turret speed, in order to detect possible differences. 10 different compression forces were evaluated and from each a representative sample of tablets was taken and examined for the in-process parameters: hardness, thickness, weight variation and disintegration time.

RESULTS, DISCUSSION AND CONCLUSION

Both batches were evaluated on physical parameters (Table 1) and no major differences were noted. Later on, the mixtures were tableted and the results are shown below.

Table 1 Evaluation of physical parameters

While Pharmatose 100M can produce tablets with measurable hard-

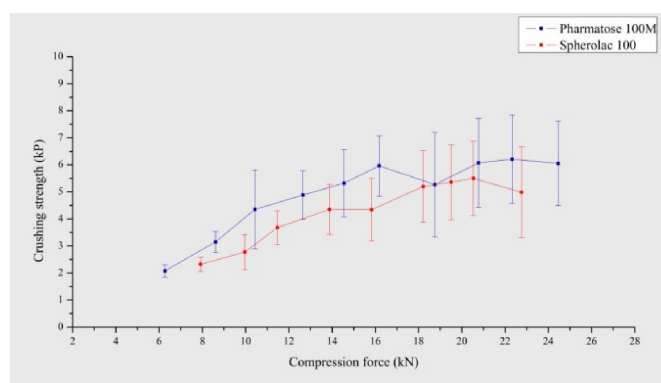
Trade mark	SpheroLac 100	Pharmatose 100
Manufacturer	Meggler	DMV-Fonterra Excipients
Batch	L1012 A4132	10446762
LOD	0.37%	0.13%
Bulk density	0.811 g/ml	0.788 g/ml
Tapped density	0.891 g/ml	0.896 g/ml
Carr index	9%	12%
Hausner ratio	1.10	1.14
Flow time	4.9s/100g	4.4s/100g
Angle of repose	39.2°	40.4°

ness at compression force as low as 6 kN, SpheroLac 100 can not (Pic.1). In the whole range of compression forces, it is a general notice that SpheroLac 100 produces softer tablets. Needs to be noticed that the variation of hardness values inside every sample, at both materials, is relatively high (represented by whiskers in Pic.1)

Pic.1 Tablet hardness vs. compression force

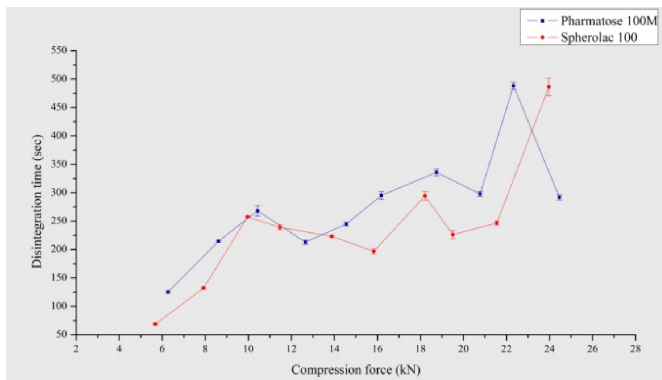
The softer tablets made from SpheroLac 100, adequately, disintegrate faster than those made from Pharmatose 100M (Pic.2).

Pic.2 Disintegrating time vs. compression force



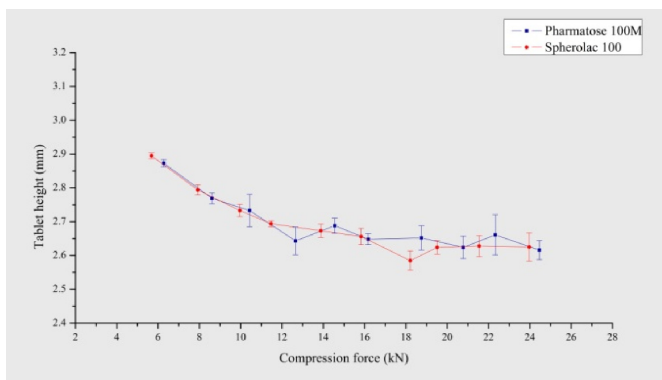
Yet, both samples disintegrate quite fast, which is expected, having in mind that Lactose Monohydrate is water soluble excipient. Process parameters for tablet weight variation and tablet height were almost identical for the samples made from both suppliers. It is noticeable that Lactose Monohydrate, as a material that consolidates predominately by fragmentation[1], reaches a point of tablet height after which no or very little change in this parameter is noticed. This is evidently for tablets from both suppliers (Pic.3).

Pic.3 Tablet height vs. compression force

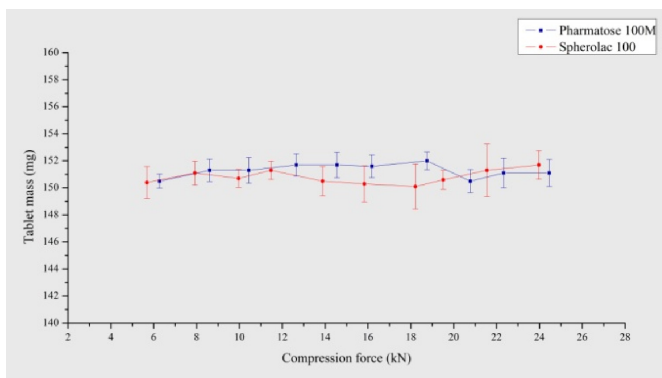


Weight variation is an indicator of narrow particle size distribution[2]. Tablets from both suppliers have almost identical weight variation (Pic.4).

Pic.4 Tablet weight variation vs. compression force



These results can lead to a conclusion that changing the type of Lactose monohydrate in a product could result in a change in its established in-process parameters. But, Lactose monohydrate, as filler in direct compression, is rarely used as it is. Combination with other fillers is more often used. In such cases, the noticed differences in process parameters between the tablets made from lactose monohydrate from both suppliers may not be apparent as much.



REFERENCES

1. Alderborn G, Nystrom C., editors. Pharmaceutical powder compaction technology. New York, NY: Marcel Dekker, Inc; 1996.
2. Fan et al., 2005 A. Fan, S. Parlerla, G. Carlson, D. Ladipo, J. Dukich, R. Capella and S. Leung, Effect of particle size distribution and flow property of powder blend on tablet weight variation, Am. Pharm. Rev. 8 (2005), pp. 73-78

ВЛИЈАНИЕ НА ПРОМЕНА НА ДОБАВУВАЧ НА ЛАКТОЗА МОНОХИДРАТ НА ПРОЦЕСНИТЕ ПАРАМЕТРИ НА ТАБЛЕТИ ПРОИЗВЕДЕНИ НА РОТАЦИОНА ТАБЛЕТ МАШИНА

Дејан Костовски, Круме Тошев, Лиљана Крстеска, Соња Угарковиќ

Истражување и развој, АЛКАЛОИД АД, Александар Македонски 12, 1000 Скопје, Република Македонија

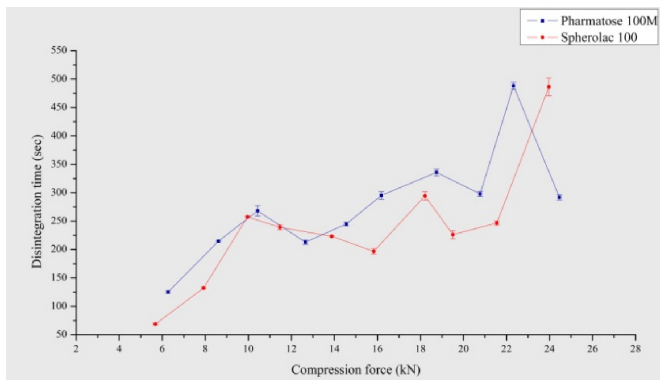
ВОВЕД И ЦЕЛ

Директната компресија е метод на кој најчесто му се дава предност при про-изводство на таблети. Еден од најшироко користените ексципиенти во директна компресија, лактоза монохидрат доаѓа во различни класи на квалитет и комер-цијални брендови. Искуството покажува дека варијации од воспоставените критериуми за процесни контроли, па дури и од спецификацијата на производот може да настанат поради промените во добавувачот. Оваа студија го евалуира влијанието на различни добавувачи на лактоза монохидрат на процесните параметри на таблетите произведени на ротациона таблет машина. Целта е споредбата на добиените резултати со цел да се идентификуваат сличностите и /или разликите.

МЕТОДОЛОГИЈА

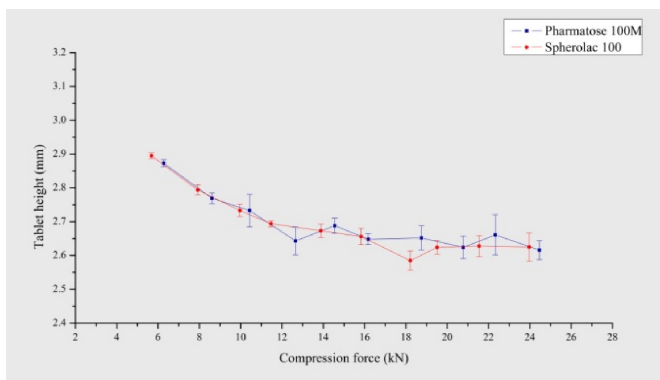
Студијата е изведена во Истражување и развој, Алкалоид АД-Скопје. Лактоза монохидрат е добиена како SpheroLac 100 (Meggler AG, Wasserburg, Germany) и Pharmatose 100M (DMV-Fonterra Excipients GmbH & Co. KG, Goch, Germany). За таа цел, две мешавини на лактоза монохидрат класа 100 и 0,5% магнезиум стеарат беа подготвени и измешани во буре-миксер. Секоја мешавина беше направена од различен извор на лактоза монохидрат. Мешавината потоа беше компресирана во таблети со просечна маса од 100 mg, користејќи 7 mm рамни клипови, монтирани на ротационата таблет машина Korsch XL 100 Pro, опремена со **PharmaControl®**. Измени беа правени на силата на компресија при максимална брзина, со цел да се откријат евентуалните разлики. Евалуирани беа 10 различни сили на компресија и за секоја од нив беше земен репрезентативен примерок од таблети и испитан за процесните параметри: цврстина, висина, варијација на маса и време на распаѓање.

Pic.3 Tablet height vs. compression force

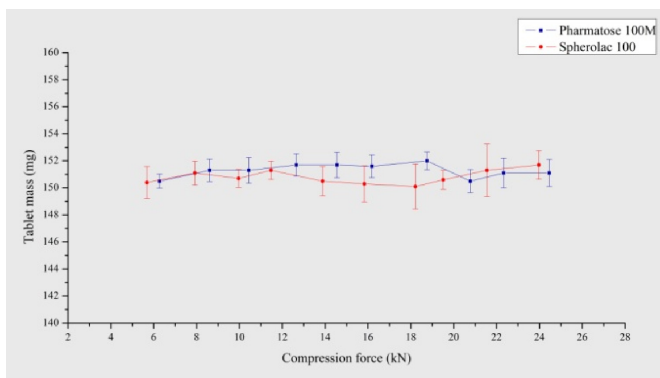


Weight variation is an indicator of narrow particle size distribution[2]. Tablets from both suppliers have almost identical weight variation (Pic.4).

Pic.4 Tablet weight variation vs. compression force



These results can lead to a conclusion that changing the type of Lactose monohydrate in a product could result in a change in its established in-process parameters. But, Lactose monohydrate, as filler in direct compression, is rarely used as it is. Combination with other fillers is more often used. In such cases, the noticed differences in process parameters between the tablets made from lactose monohydrate from both suppliers may not be apparent as much.



REFERENCES

1. Alderborn G, Nystrom C., editors. Pharmaceutical powder compaction technology. New York, NY: Marcel Dekker, Inc; 1996.
2. Fan et al., 2005 A. Fan, S. Parlerla, G. Carlson, D. Ladipo, J. Dukich, R. Capella and S. Leung, Effect of particle size distribution and flow property of powder blend on tablet weight variation, Am. Pharm. Rev. 8 (2005), pp. 73-78

ВЛИЈАНИЕ НА ПРОМЕНА НА ДОБАВУВАЧ НА ЛАКТОЗА МОНОХИДРАТ НА ПРОЦЕСНИТЕ ПАРАМЕТРИ НА ТАБЛЕТИ ПРОИЗВЕДЕНИ НА РОТАЦИОНА ТАБЛЕТ МАШИНА

Дејан Костовски, Круме Тошев, Лиљана Крстеска, Соња Угарковиќ

Истражување и развој, АЛКАЛОИД АД, Александар Македонски 12, 1000 Скопје, Република Македонија

ВОВЕД И ЦЕЛ

Директната компресија е метод на кој најчесто му се дава предност при про-изводство на таблети. Еден од најшироко користените ексципиенти во директна компресија, лактоза монохидрат доаѓа во различни класи на квалитет и комер-цијални брендови. Искуството покажува дека варијации од воспоставените критериуми за процесни контроли, па дури и од спецификацијата на производот може да настанат поради промените во добавувачот. Оваа студија го евалуира влијанието на различни добавувачи на лактоза монохидрат на процесните параметри на таблетите произведени на ротациона таблет машина. Целта е споредбата на добиените резултати со цел да се идентификуваат сличностите и /или разликите.

МЕТОДОЛОГИЈА

Студијата е изведена во Истражување и развој, Алкалоид АД-Скопје. Лактоза монохидрат е добиена како SpheroLac 100 (Meggler AG, Wasserburg, Germany) и Pharmatose 100M (DMV-Fonterra Excipients GmbH & Co. KG, Goch, Germany). За таа цел, две мешавини на лактоза монохидрат класа 100 и 0,5% магнезиум стеарат беа подготвени и измешани во буре-миксер. Секоја мешавина беше направена од различен извор на лактоза монохидрат. Мешавината потоа беше компресирана во таблети со просечна маса од 100 mg, користејќи 7 mm рамни клипови, монтирани на ротационата таблет машина Korsch XL 100 Pro, опремена со **PharmaControl®**. Измени беа правени на силата на компресија при максимална брзина, со цел да се откријат евентуалните разлики. Евалуирани беа 10 различни сили на компресија и за секоја од нив беше земен репрезентативен примерок од таблети и испитан за процесните параметри: цврстина, висина, варијација на маса и време на распаѓање.

РЕЗУЛТАТИ, ДИСКУСИЈА И ЗАКЛУЧОК

Двете серии беа евалуирани за физичките параметри (табела 1) и големи разлики не беа забележани. Подоцна, мешавините беа таблетирани и резултатите се прикажани подолу.

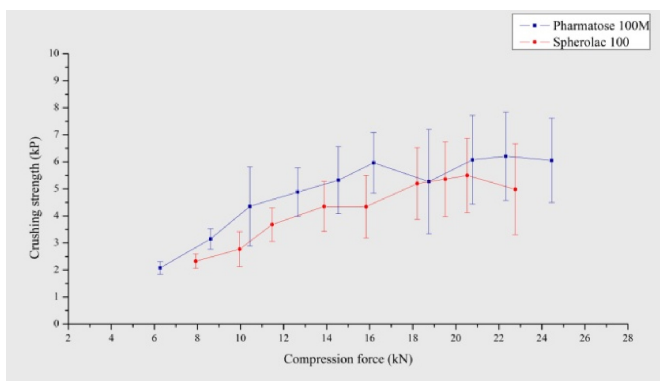
Табела 1. Споредба на физичките параметри

Додека Pharmatose 100M може да произведе таблети со мерлива цврстина при ниска сила на компресија (6 kN), Spherolac 100 не

Trade mark	Spherolac 100	Pharmatose 100
Manufacturer	Meggle	DMV-Fonterra Excipients
Batch	L1012 A4132	10446762
LOD	0.37%	0.13%
Bulk density	0.811 g/ml	0.788 g/ml
Tapped density	0.891 g/ml	0.896 g/ml
Carr index	9%	12%
Hausner ratio	1.10	1.14
Flow time	4.9s/100g	4.4s/100g
Angle of repose	39.2°	40.4°

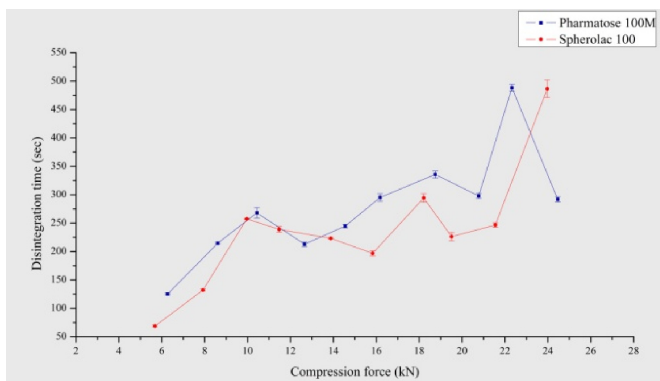
може (Слика.1). Во цели-от ранг на сили на компресија, општо забележително е дека Spherolac 100 произведува таблети со помала цврстина. Треба да се забележи дека варијацијата во цврстината на таблетите, кај секој примерок од двата материјали, е релативно висока (претставена со разделци на Слика 1).

Слика 1. Цврстина на таблети vs. сила на компресија



Таблетите со пониска цврстина произведени од Spherolac 100, се распаѓаат побрзо од оние произведени од Pharmatose 100M (Слика 2).

Слика 2. Време на распаѓање vs. сила на компресија



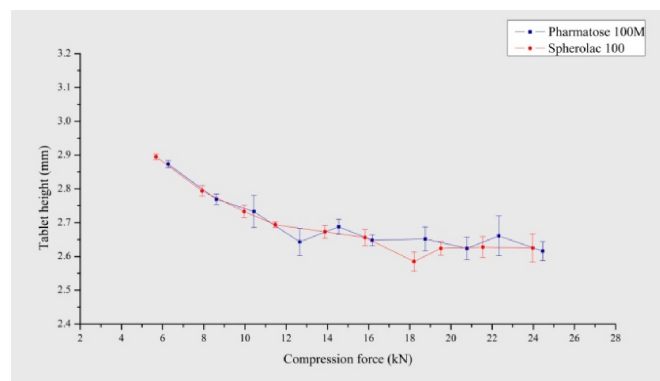
Сепак и двата примерока се распаѓаат многу брзо, што е и очекувано, имајќи во предвид дека лактоза монохидрат е ексципиент растворлив во вода.

Процесните параметри за варијација на маса и висина на таблета беа речиси идентични за примероците од двата добавувачи.

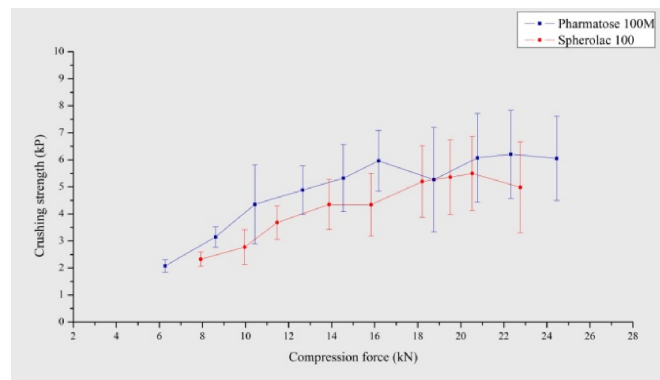
Забележливо е дека лактоза монохидрат, како материјал што консолидира претежно со фрагментација[1], достигнува одредена точка на висина на таблетите по која нема или се забележува многу мала промена во овој параметар. Ова е очигледно за таблетите од двата добавувачи (Слика 3).

Варијацијата во маса е показател за воедначеност во дистрибуција по големина на честичките[2]. Таблетите од двата добавувачи имаат речиси идентична варијација во маса (Слика 4).

Слика 3. Висина на таблети vs. сила на компресија



Слика 4. Варијација на маса на таблети vs. сила на компресија



Овие резултати можат да доведат до заклучок дека промената на типот на лактоза монохидрат во еден производ може да доведе до промена во нејзините воспоставени процесни параметри. Но лактоза монохидрат, како полнител во директна компресија, ретко се користи самостојно. Почесто се употребува во комбинација со други полнителни. Во такви случаи, забележаните разлики во процесните параметрите помеѓу таблетите направени од лактоза монохидрат од двата добавувачи може и да не бидат толку воочливи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alderborn G, Nystrom C., editors. Pharmaceutical powder compaction technology. New York, NY: Marcel Dekker, Inc; 1996.p45
2. Fan et al., 2005 A. Fan, S. Parlerla, G. Carlson, D. Ladipo, J. Dukich, R. Capella and S. Leung, Effect of particle size distribution and flow property of powder blend on tablet weight variation, Am. Pharm. Rev. 8 (2005), pp. 73-78

STATIC IMAGE ANALYSIS STUDY OF THE MORPHOLOGICAL PROPERTIES OF CRYSTALLINE PHARMACEUTICALLY ACTIVE INGREDIENT

Dejan Kostovski, Gjorgji Petruševski, Liljana Krsteska, Sonja Ugarkovic

Research and Development, ALKALOID AD, Aleksandar Makedonski 12, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

INTRODUCTION AND AIM

Nowadays, there are several techniques available for determination of particle size distribution. Sieving is one of the oldest methods, still in use today. Other methods, like Electrozone sensing (Coulter Counter) and Laser diffraction, are also broadly accepted as standard in different fields of use. Brand new method for particle size measurement is the Static image analysis. The significant advances in imaging technologies and computing power have had an impact on recent development of image analysis[1]. Unlike all other methods for particle size measurement, this method can provide a direct insight of the particles measured. Even greater advantage is the ability to determine the morphological properties of the material being measured. Particle shape is important in most of the pharmaceutical applications: flowability and blending, tableting and compaction behavior, dissolution behavior and bioavailability and etc. It is also very important indicator for the batch to batch consistency testing.

As model drug compound Rosiglitazone maleate was selected and detailed study of the morphological properties was performed. The following parameters were assed for particle characterization: High Sensitivity (HS) Circularity, Aspect ratio and Elongation.

METHODOLOGY

The morphology study was conducted on Morphologi G3S – automated particle characterization system, equipped with a inbuilt dry dispersion unit, Nikon 5 MPix CCD camera and Morphology software, ver. 7.0 (Malvern instruments, Worcestershire, UK). Rosiglitazone maleate was obtained from **Dr. Reddy's Laboratories (Dr. Reddy's Laboratories Ltd, Banjara Hills, Hyderabad Andhra Pradesh - India)**. Previously, the method of dispersion was optimized using different sets of optic selection, pressure values and volume of sample for analysis. In order to have valid data for conclusion, five consecutive measurements were performed and statistical interpretation was applied.

RESULTS AND DISCUSSION

The microscopically view provides valuable information about particles themself. At a first glance, Rosiglitazone maleate particles seem as acicular, needle-like particles. Large aggregates are seen, which can be broken down to primary crystals using appropriate dispersion pressure (Fig. 1). Also, existence of small particles was observed. The particle shape was found being size dependable (from needle like crystals to smallest round particles).

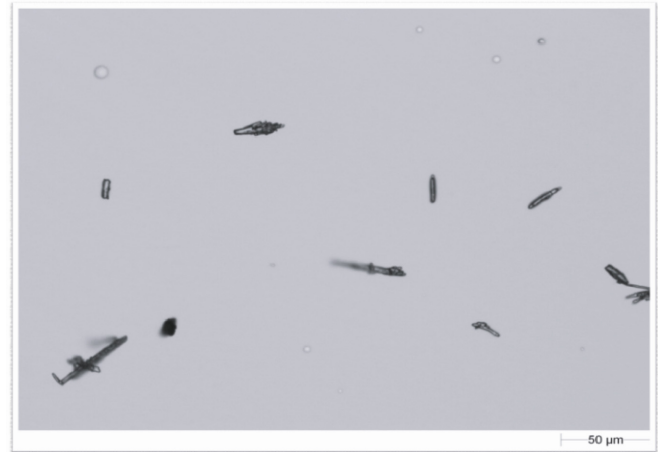


Figure 1. Micrograph from the dry dispersion field of Rosiglitazone maleate

The parameter HS Circularity describes the particles as perfect circle with values close to 1.0, and a narrow rod close to 0. Aspect ratio is the ratio of the width to the length of the particle. Aspect ratio values ranges from 0 to 1.0. Elongation is a value of 1 minus the value obtained for the Aspect ratio [2]. A rod for example, has a high elongation.

The obtained results are shown in Tables 1-3 and Fig.2-4.

Table 1. HS Circularity data

Sample code	Particles No.	D[n, 0.1]	D[n, 0.5]	D[n, 0.9]
4	23671	0,415	0,727	0,896
5	21454	0,445	0,741	0,886
6	31839	0,428	0,722	0,892
7	19078	0,448	0,737	0,904
8	47775	0,412	0,715	0,901
SD	/	0,02	0,01	0,01
Average	/	0,43	0,73	0,90

Figure 2. Graph for parameter HS Circularity

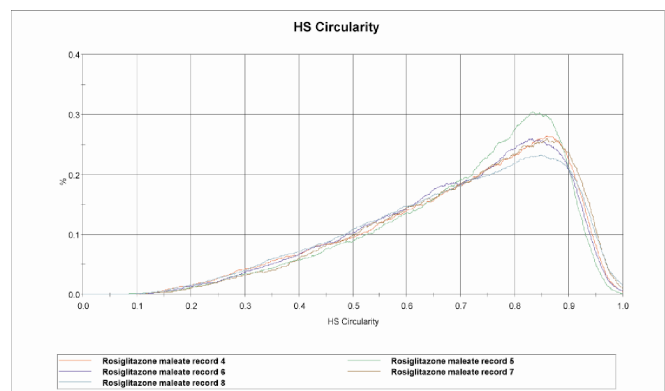


Table 2. Elongation data

Sample code	Particles No.	D[n, 0.1]	D[n, 0.5]	D[n, 0.9]
4	23671	0,155	0,408	0,668
5	21454	0,145	0,395	0,658
6	31839	0,161	0,415	0,662
7	19078	0,155	0,413	0,667
8	47775	0,163	0,42	0,668
SD	/	0,01	0,59	0,00
Average	/	0,16	0,41	0,66

Figure 3. Graph for parameter Elongation

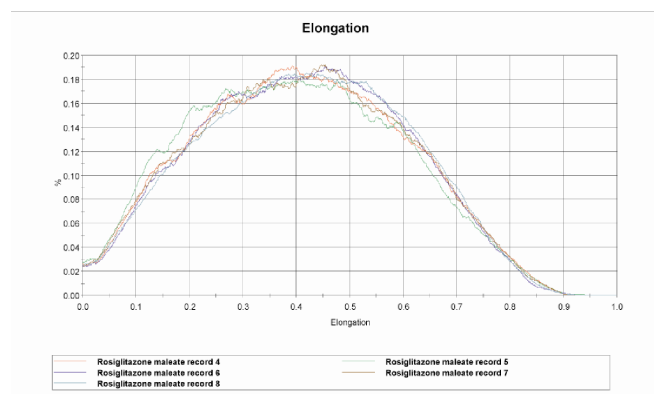
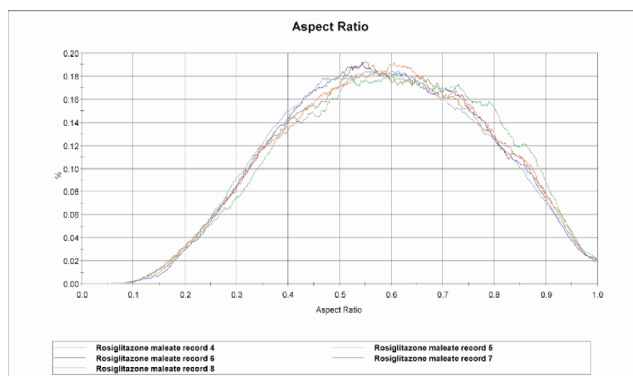


Table 3. Aspect ratio data

Sample code	Particles No.	D[n, 0.1]	D[n, 0.5]	D[n, 0.9]
4	23671	0,33	0,589	0,842
5	21454	0,34	0,603	0,852
6	31839	0,336	0,582	0,837
7	19078	0,331	0,585	0,842
8	47775	0,33	0,578	0,835
SD	/	0,00	0,59	0,01
Average	/	0,33	0,59	0,84

Figure 4. Graph for parameter Aspect ratio



CONCLUSION

According to statistical data and graphs, it can be concluded that the results are consistent and can be considered accurate. Although, at microscopic view needle like crystals of Rosiglitazone maleate are observed, the HS Circularity parameter exhibited some surprising results. High HS Circularity values show existence of majority of fine particles, with origin from milling operations or/and broken crystals during pressure dispersion of the sample. Elongation and Aspect ratio graphs pointed out to both elongated needle like larger crystals, and certain portion of fines. This combination of different sizes and shapes of Rosiglitazone maleate particles gives the morphological pattern of the batch and can be compared for determination of batch to batch consistency.

REFERENCES

- Sandler N, "Static image analysis in particle size measurement of pharmaceutical solids," American Pharmaceutical Review, January; February 2006, vol./is. 9/1(54-57), 1099-8012 (January/February 2006)
- Morphologi G3 user manual, MAN0410 Issue 1.0; November 2007, Malvern Instruments Ltd. 2007, p.2-7- 2-13

ИЗУЧУВАЊЕ НА МОРФОЛОШКИТЕ КАРАКТЕРИСТИКИ НА КРИСТАЛИ ОД АКТИВНА СУПСТАНЦА СО УПОТРЕБА НА СОФТВЕРСКА АНАЛИЗА НА ФИКСНИ ДИГИТАЛНИ МИКРОФОТОГРАФИИ

Дејан Костовски, Ѓорѓи Петрушевски, Лиљана Крстеска, Соња Угарковиќ

Истражување и Развој, Алкалоид АД-Скопје,
АлександарМакедонски 12, 100 Скопје, Република Македонија

ВОВЕД И ЦЕЛ

Во денешно време достапни се повеќе техники за одредување на големината на честичките. Сеењето е еден од најстарите методи, сеуште во употреба. Други методи, како осетливост на промена на електрични полиња (Electrozone sensing -Coulter Counter) и ласерска дифракција (Laser diffraction) се исто така широко прифатени како стандард во различни апликации. Сосема нов метод за одредување на големина на честичките е софтверската анализа на фиксни дигитални микрофотографии (Static image analysis). Напредокот во дигиталното фотографирање и информатичката технологија имаа голем удел во развојот на оваа техника [1]. За разлика од останатите методи, со оваа метода може да обезбеди непосреден микроскопски увид во примерокот кој е предмет на анализа. Уште поголема предност е можноста дополнително да се изучуваат морфолошките својства. Обликот на честичките е значаен параметар во голем број на фармацевтски процеси: проток, мешање, таблетирање и компресибилни својства, растворање, биорасположивост и биоеквиваленца и др. Морфолошките својства се важен индикатор за конзистентноста на материјалот со потекло од различни производствени серии. Како модел за активна супстанца во овој труд е користен Rosiglitazone maleate врз кој е изведена детална студија на морфолошките својства. За таа цел беа искористени морфолошките параметри: Високо Сензитивна (BC) Циркуларност (HS circularity), Односот ширина/должина (Aspect ratio) и Елонгацијата (Elongation).

МЕТОДОЛОГИЈА

Морфолошката студија беше изведена на Morphologi G3S-автоматизиран систем за карактеризација на честички, опремен со комора за сува дисперзија, Nikon 5 MPix CCD камера, и Morphology софтвер, вер. 7.0. Rosiglitazone maleate беше набавен од **Dr. Reddy's Laboratories**. Претходно, употребената метода беше целосно оптимизирана со варирање на критичните параметри.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Микроскопската претрага овозможува осознавање на значајни информации за самите честички. Во зависност од големината, честичките од Rosiglitazone maleate варираат помеѓу големи честички со исклучително игличест облик (дел од нив со изразена агрегација) и многу мали честички со изразен сферичен хабитус (Сл. 1).



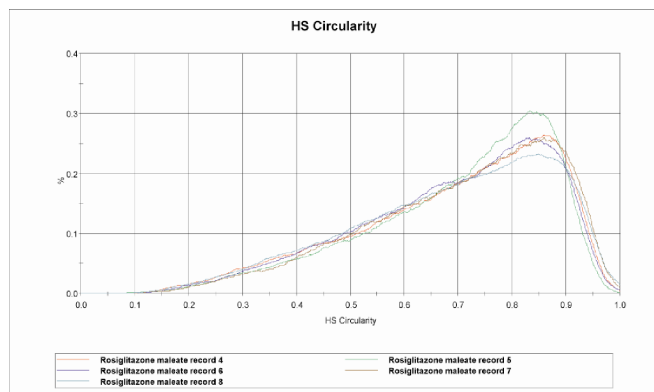
Слика 1. Микрофотографија од сува дисперзија на Rosiglitazone maleate

Параметарот ВС Циркуларност ги опишува честичките како идеални кругови доколку имаат вредност блиску до 1.0, а стапчести/игличести со вредности блиски до 0. Односот на ширина/должина на честичките има вредности во интервалот 0-1.0. Елонгација е вредноста од 1 минус вредноста на односот ширина/должина. Стапчест облик, на пример, има висока елонгација[2]. Добиените резултати се прикажани во Табелите 1-3 и Сликите 2-4.

Табела 1. Податоци за ВС Циркуларност

Слика 2. График за параметарот ВС Циркуларност

Sample code	Particles No.	D[n, 0.1]	D[n, 0.5]	D[n, 0.9]
4	23671	0,415	0,727	0,896
5	21454	0,445	0,741	0,886
6	31839	0,428	0,722	0,892
7	19078	0,448	0,737	0,904
8	47775	0,412	0,715	0,901
SD	/	0,02	0,01	0,01
Average	/	0,43	0,73	0,90



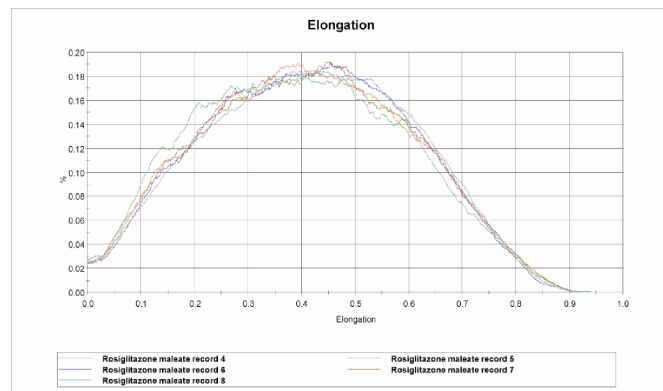
Табела 2. Податоци за Елонгација

Sample code	Particles No.	D[n, 0.1]	D[n, 0.5]	D[n, 0.9]
4	23671	0,155	0,408	0,668
5	21454	0,145	0,395	0,658
6	31839	0,161	0,415	0,662
7	19078	0,155	0,413	0,667
8	47775	0,163	0,42	0,668
SD	/	0,01	0,59	0,00
Average	/	0,16	0,41	0,66

ЗАКЛУЧОК

Како што може да се забележи од статистичките податоци и сликите, резултатите се доследни и можат да се сметаат за точни. Иако при класичната микроскопска анализа се забележа воглавно игличест облик на кристалите, морфолошкиот параметар ВС Циркуларност открива интересни и неочекувани резултати. Имено, овој параметар го потврди постоењето на fini честички, со потекло од мелење и/или искршени делчиња од кристали во процесот на дисперзија на примерокот.

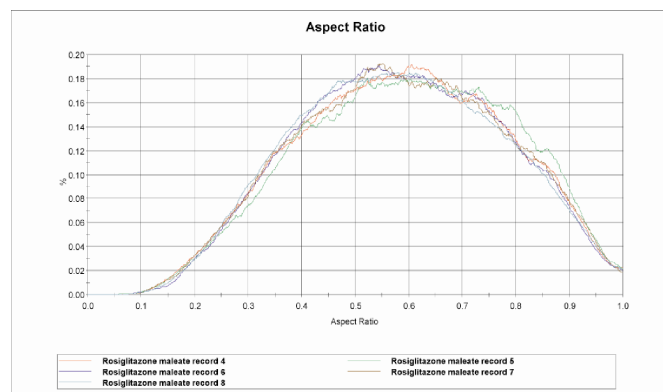
Слика 3. График за параметарот Елонгација



Табела 3. Податоци за односот ширина/должина

Sample code	Particles No.	D[n, 0.1]	D[n, 0.5]	D[n, 0.9]
4	23671	0,33	0,589	0,842
5	21454	0,34	0,603	0,852
6	31839	0,336	0,582	0,837
7	19078	0,331	0,585	0,842
8	47775	0,33	0,578	0,835
SD	/	0,00	0,59	0,01
Average	/	0,33	0,59	0,84

Слика 2. График за односот ширина/должина



Параметрите Елонгација и Односот ширина-должина укажуваат на постоење поголеми игличести кристали како и помал удел на

фини честички. Како заклучок, може да се каже дека оваа комбинација на честички со различна големина и облик го дава морфолошкиот профил на серијата и може да се користи за одредување на конзистентноста на материјалот со потекло од различни серии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sandler N, "Static image analysis in particle size measurement of pharmaceutical solids," American Pharmaceutical Review, January; February 2006, vol./is. 9/1(54-57), 1099-8012 (January/February 2006)
2. Morphologi G3 user manual, MAN0410 Issue 1.0; November 2007, Malvern Instruments Ltd. 2007, p.2-7- 2-13

USE OF DESCRIPTIVE STATISTICS FOR EVALUATION OF THE TABLETING PROCESS OF ZOLPIDEM 5 mg FILM-COATED TABLETS AS A PART OF CONCURRENT VALIDATION

Bosilka Stefanova, Packa Antovska, Sonja Dimčevska, Sonja Ugarković, Blagica Debarlieva, Filip Butikoski

Research and Development, ALKALOID AD, Aleksandar Makedonski 12, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

Concurrent Validation includes validating the process during the regular production. Descriptive statistics is a tool to characterize the basic features of data in a study. Together with simple graphics analysis, they form the basis of virtually every quantitative analysis of data.

AIM

To confirm the selected parameters for tableting process of Zolpidem 5 mg film-coated tablets. With statistic evaluation to show that the obtained data are within the limits of specification so the process of tableting of Zolpidem 5 mg film-coated tablets is validated and always gives a quality product that meets the previously defined specification of quality.

MATERIALS AND METHODS

Subject for concurrent validation are three consecutive production batches of Zolpidem 5 mg film-coated tablets. The results of in-process controls of tablet cores (average mass, hardness and thickness) and the results of control tests on the assay of the active ingredient in tablet cores are subject to statistical analysis using Process capability.

The results of this statistical evaluation are presented below:

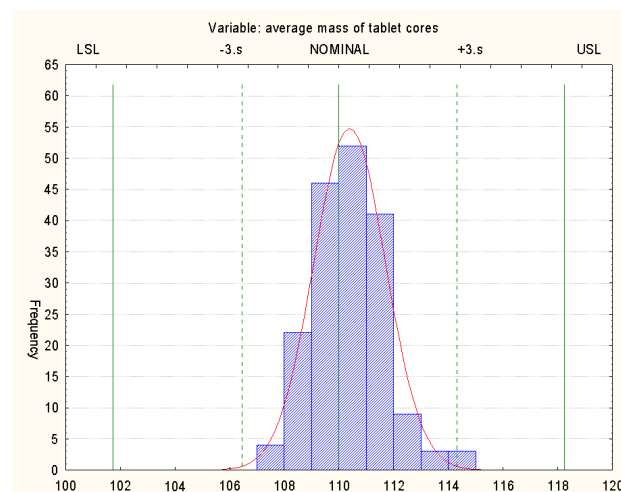


Figure 1:
Average mass of tablet cores (n=180)

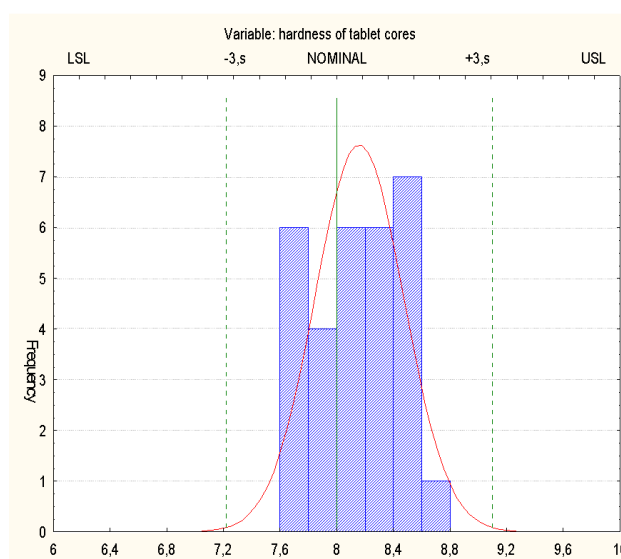


Figure 2:
Hardness of tablet cores (n=30)

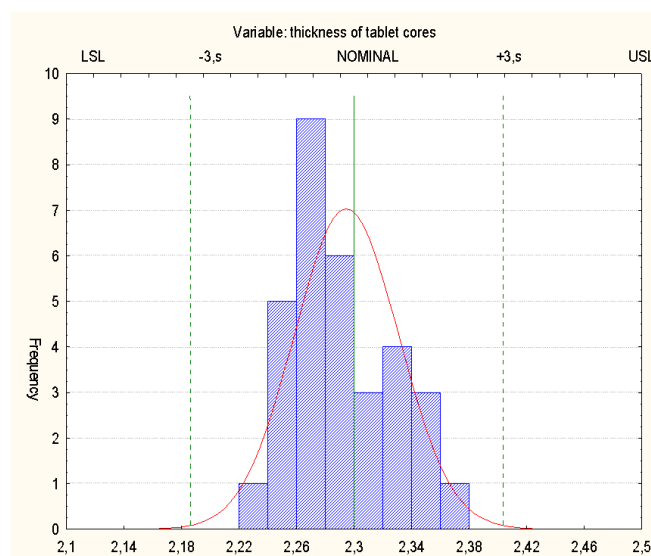


Figure 3:
Thickness of tablet cores (n=30)

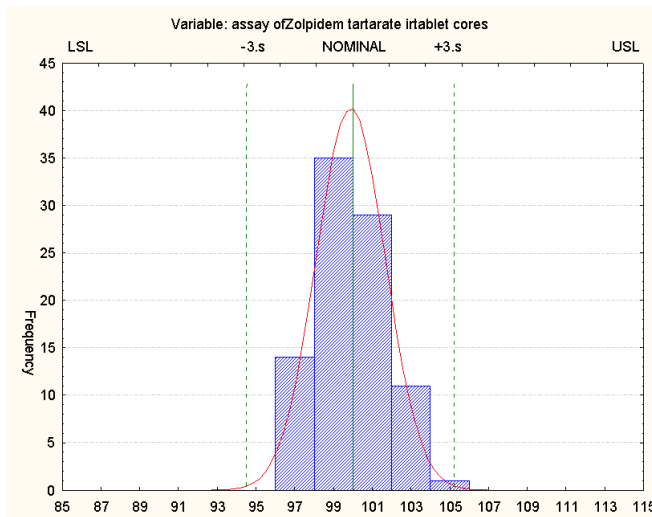


Figure 4:
Assay of Zolpidem tartarate in tablet cores (n=90)

n - number of analyzed values

Process capability is demonstrated by two indexes: Cp (index of process centering, index of potential ability) and Cpk (process capability index). For capable process this two indexes should be > 1,3. When the process is perfectly centered Cp = Cpk.

Table 1:

Evaluated parameter Cp values Cpk values Average mass of tablet cores 2,09 2,00 Hardness of tablet cores 2,18 2.16 Thickness of tablet cores 1,83 1,78 Assay of Zolpidem tartarate in tablet cores 2,80 2,78

Evaluated parameter	Cp values	Cpk values
Average mass of tablet cores	2,09	2,00
Hardness of tablet cores	2,18	2.16
Thickness of tablet cores	1,83	1,78
Assay of Zolpidem tartarate in tablet cores	2,80	2,78

CONCLUSION

Descriptive statistics is useful tool for statistical evaluation of results from in-process controls and control tests during tableting, witch confirmed that the tableting process of Zolpidem 5 mg film-coated tablets always gives a product which meets its predetermined specifications.

REFERENCES

1. Sanford Bolton, Charles Bon, Pharmaceutical Statistics, Practical and Clinical Applications (2004)
2. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations (2006)
3. British Pharmacopoeia 7.1 (2011)

УПОТРЕБА НА ДЕСКРИПТИВНА СТАТИСТИКА ЗА ЕВАЛУАЦИЈА НА ПРОЦЕСОТ НА ТАБЛЕТИРАЊЕ НА ZOLPIDEM 5 mg ФИЛМ-ОБЛОЖЕНИ ТАБЛЕТИ КАКО ДЕЛ ОД ТЕКОВНА ВАЛИДАЦИЈА

Босилка Стефанова, Пацка Антовска, Соња Димчевска, Соња Угарковиќ, Благица Дебарлиева, Филип Бутикоски.

Истражување и развој, АЛКАЛОИД АД, Александар Македонски 12, 1000 Скопје, Република Македонија

Тековната валидација (Concurrent Validation) опфаќа валидирање на процесот за време на редовното производство. Дескриптивната статистика е алатка со која помош може да се карактеризираат податоците кои се цел на обработка. Зедно со едноставна графичка анализа претставува основа на секоја квантитативна анализа на податоци.

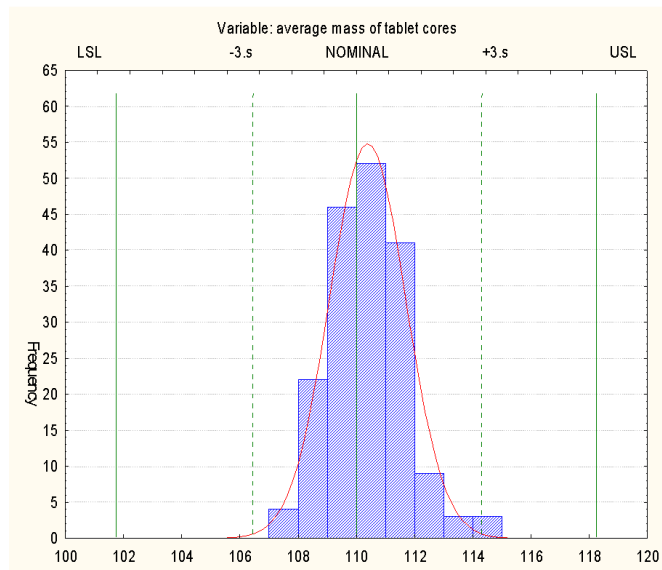
ЦЕЛ

Да се потврдат избраните параметри при процесот на таблетирање на Zolpidem 5 mg филм-обложени таблети. Со статистичка обработка на добиените податоци да се потврди дека резултатите се во рамките на спецификациските лимити со што може да се смета дека процесот на таблетирање е валидиран и способен континуирано да дава производ со однапред предодредени карактеристики.

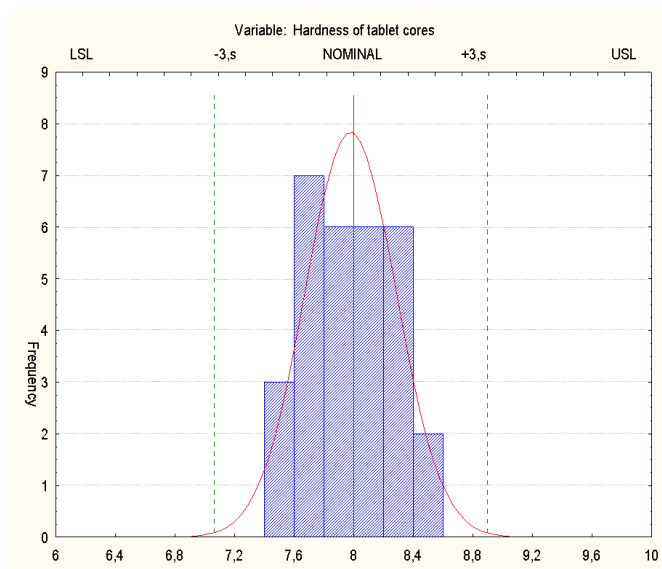
МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Предмет на тековната валидација се три последователни производни серии на Zolpidem 5 mg филм-обложени таблети. Резултатите од процесните контроли на таблетните јадра (просечна маса, цврстина и висина) како и резултатите од контролните тестови за содржина на активната компонента во таблетните јадра се предмет на статистичка анализа со помош на статистичката алатка – способност на процес (Process capability) Резултатите од оваа статистичка евалуација се прикажани во подолу:

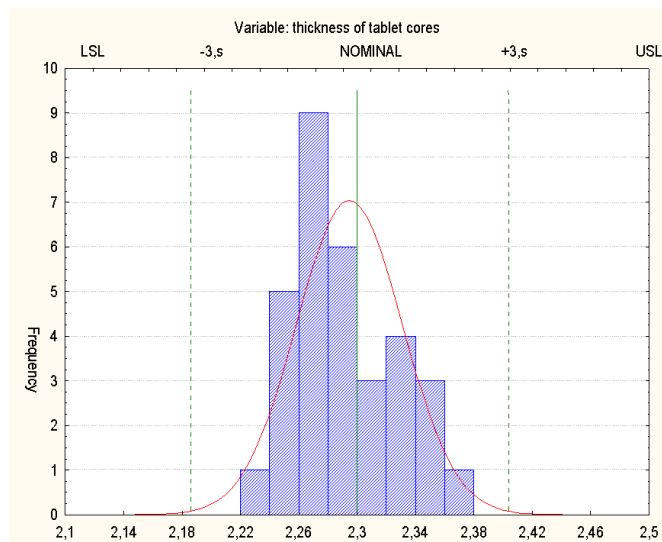
Слика 1: просечната маса на таблетните јадра (n=180)



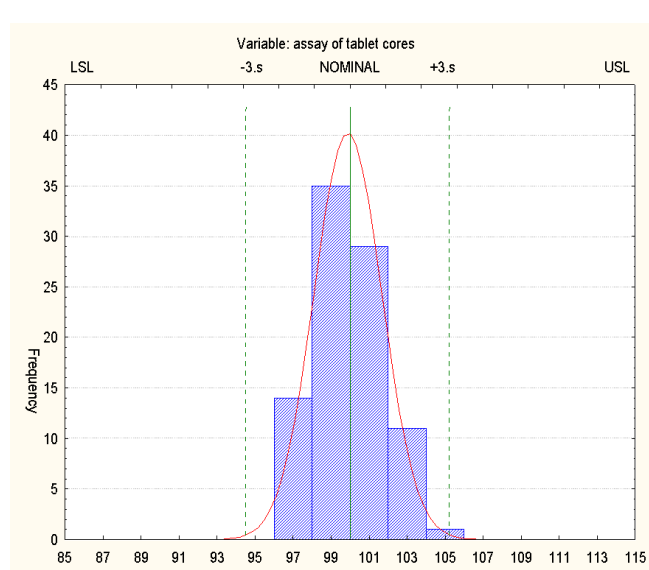
Слика 2: цврстина на таблетни јадра (n=30)



Слика 3: висина на таблетните јадра (n=30)



Слика 4: содржина на Zolpidem tartarate во таблетните јадра (n=90)



n – број на анализирани вредности

За прикажување на способност на процесот (Process capability) најчесто се користат два вида на индекси Cp (индекс на центрирање на процес, индекс на потенцијална способност) и Cpk (индекс на поместување на процес, индекс на изворедност на процес). За квалитетен процес вредностите на овие два индекси треба да се > 1,3. Кога процесот е перфектно центриран Cp= Cpk.

Табела 1:

Евалуиран параметар	Вредност на Cp	Вредност на Cpk
Просечна маса на таблетни јадра	2,09	2,00
Цврстина на таблетни јадра	2,18	2,16
Висина на таблетни јадра	1,83	1,78
Содржина на Zolpidem tartarate во таблетните јадра	2,80	2,78

ЗАКЛУЧОК

Дескриптивната статистика се покажа како корисна алатка за статистичка обработка на резултатите од процесните контроли, и контролните тестови, при таблетирање со што се потврди дека процесот на таблетирање на Zolpidem 5 mg филм-обложени таблети секогаш дава производ чиј квалитет одговара и е во рамките на претходно дефинираните спецификации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sanford Bolton, Charles Bon, Pharmaceutical Statistics, Practical and Clinical Applications (2004)
2. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations (2006)
3. British Pharmacopoeia 7.1 (2011)

DEVIATION MANAGEMENT IN INTEGRATED PHARMACEUTICAL QUALITY SYSTEM

Nada Popstefanova, Marija Davcheva, Miroslava Ilievska, Svetlana Trajkoska Dabevska

ALKALOID AD, Skopje

INTRODUCTION

In general terms, a deviation is non-compliance with an established standard. The EU Guide to Good manufacturing Practice (GMP) states that any deviation from the approved requirements and procedures must be documented and explained. Integrated Pharmaceutical Quality System is to be measured by complaints, deviations, CAPA, changes and inspection observations. Quality Assurance needs to go beyond measuring failure to maximize value to the organization.

GOAL

Investigation of failure, deviation and OOS (out of specification) in the pharmaceutical industry is a regulatory requirement. Recording the deviation and investigating their cause is one step to meet regulatory requirements. Correcting the issue based on risk assessment and understanding of the science as well as ensuring that the corrective actions are implemented within the appropriate time frame is another step. Follow-up of the actions to ensure they are completed, effective and the fact that no new issues have been introduced is what completes activities. A summary report must be developed, reviewed and approved by the Quality Assurance. Successful approval of deviations and OOS, as well as deviation rate is KPI (key performance indicator) for assuring overall Integrated Pharmaceutical Quality System and proactive approach to continuous quality improvement.

METHODS

Process monitoring, Quarterly Review of all deviation reports as well as Annual product Reviews (APR) are the tools necessary to ensure that negative trends do not develop and that manufacturing process remains under control. Using risk management to deal with deviation provides a consistent framework for decision-making based on documentary and scientific records, while also enabling decisions to be confidently upheld before the regulatory bodies. Risk management tool for classifying and handling deviations is flowchart for deciding the criticality of deviation.

In the example of medical device – X-ray films and concentrated solutions for haemodialysis, it is assumed that the process in which the deviation arose has undergone appropriate risk analysis, so the following are known:

- » Failure (deviation) history with associated severity assessment criteria
- » Probability data for the most commonly occurring failures (deviations);
- » Critical points and/or stages in the process;

- » A definition of the product's critical quality attributes.
- » The methodology which is employed consists of several phases - analysis phase, classification phase and treatment phase.

ANALYSIS PHASE

The aim of this phase is to place the event that has occurred into one of the pre-established categories. This is done using a detection tree based on a set of questions with yes/no answers, directly defining the category of the event.

CLASSIFICATION PHASE

Having followed the strategy, the event is classified into one of following categories: incident; non-critical deviation and critical deviation.

TREATMENT PHASE

based on the category into which the event has been placed, action are taken as follows:

Incident: If the event is classed as an "Incident" is the closed, as the actions required to resolve it are described.

Non – critical deviation: The process deviation database is consulted to see how many times it has happened. If the specified maximum number of repeats allowed has not been exceeded, the event stays in the "Non-critical deviation" category (minor and major)

Critical deviation: The event is placed in this category:

- » When the answers given in the detection tree point to a "Critical deviation";
- » If it was first classified as "Non-critical", but has exceeded the maximum number of repeats allowed.

RESULTS

In range of one year, deviations are monitored and analyzed for medical device – X-ray films and concentrated solutions for haemodialysis in Production of medical devices in Alkaloid AD. Types of nonconformities for finished product X-ray films are classified in numerous categories (a-m). Deviations are evaluated as incidents and non-critical (minor and major). Deviations considering monitoring of environment conditions in production and storage area are classified as incidents. Deviations considering finished product X-ray films and concentrated solutions for haemodialysis are classified as non-critical (minor and major). The applied actions usually decrease risk on acceptable level. There are corrective and preventive actions suitable for appropriate deviations. These corrective actions contribute to the reduction or removal of specified risk the consequences of the product and its application. The final approval of closed deviation is performed by Quality Assurance before batch release of product.

CONCLUSION

This abstract describe the use of risk analysis tools for managing deviations within the context of pharmaceutical production. This method involve using a decision diagram to classify deviations by their impact on product quality, based on definitions contained in ICH Q7A. By finally incorporating the information generated into the general risk analysis for the process, knowledge of the process can be constantly updated in terms of:

- » Critical points: redefining the control limits;
- » Critical product quality attributes and how they relate the process parameters;
- » Process capacity data;

The effectiveness of actions within the CAPA system.

This approach enables deviations to be handled effectively, reduces the resources needed by eliminating irrelevant incidents and gives proactive approach of continuous improvement.

REFERENCES:

ICH Q9, ICH Q10, ICH Q7A
EC Directive 93/42/EEC of June 14,1993 and amended M5
21 CFR part 211 requirements regarding deviations and role of quality unit

УПРАВУВАЊЕ СО ДЕВИЈАЦИИ ВО ИНТЕГРИРАНИОТ СИСТЕМ ЗА КВАЛИТЕТ ВО ФАРМАЦИЈАТА

Нада Попстефанова, Марија Давчева, Мирослава Илиевска, Светлана Трајкоска Дабеvsка,

АЛКАЛОИД АД, Скопје

ВОВЕД

Општо, девијација (остапување) е неусогласеност со воспоставен стандард. Во Европскиот водич за Добрата Производна Пракса (ДПП) се наведува дека секое отстапување од прифатените барања и постапки треба да бидат документирани и објаснети. Интегрираниот систем за квалитет во фармацијата се мери според рекламациите, девијациите, корективни и превентивни мерки и инспекциски наоди. Обезбедувањето на квалитет треба да ги надмине недостатоците и да ја зголеми вредноста на организацијата.

ЦЕЛ

Иследувањето на недостатокот, девијацијата и резултатите надвор од границите на спецификацијата (OOS) во фармацевтската индустрија е регулаторно барање. Бележењето на девијацијата и иследувањето на нејзината причина е еден чекор од исполнувањето на регулаторните барања. Уште еден неопходен чекор е корегирање на наодот и заклучок базиран на проценка на ризикот, како и разбирање и утврдување на корективните мерки и спроведување на истите во соодветниот рок. Спроведувањето на мерките треба да обезбеди дека истите се целосни, ефективни и без повторно случување на отстапувањето, со што се комплетира активноста. Целосниот извештај треба да биде развиен, прегледан и одобрен од Обезбедување на квалитет. Успешното одобрување на девијацијата и OOS, како и бројот/уделот на девијации е клучен индикатор да се обезбеди целосно интегриран систем за квалитет во фармацијата, како и научен пристап за постојано подобрување на квалитетот.

МЕТОДИ

Следењето на процесот, квартален преглед на сите извештаи од остапувањата како и годишни прегледи на производот се неопходните алатки за одредување дека негативните трендови не се развиваат, а производниот процес и понатаму е под контрола. Управувањето со ризик се користи за да се обезбеди постојан систем за донесување одлуки врз основа на научни и документирани записи, со што се овозможува одлуките да се потврдат и пред регулаторните тела. Управувањето со ризик како алатка за класификација и обработка на девијациите овозможено е со

дијаграм на тек преку кој се донесува одлука за критичноста на девијацијата. Во примерот за медицински помагала - рентген филмови и концентрирани раствори за хемодијализа, процесот во кој се појавува девијацијата е подложен на соодветна ризик анализа, па познати се следниве видови анализи:

- » Историја на девијацијата поврзана со сериозноста на прифатливиот критериум;
- » Можните податоци за најчестите настанати девијации;
- » Критичните точки и /или фази од процесот;
- » Дефиниција за критичните својства за квалитетот на производот;

Употребената методологија содржи неколку фази: анализирање, класификација и обработка на девијацијата.

ФАЗА ЗА АНАЛИЗИРАЊЕ

целта на оваа фаза е настанот што се случил да се класифицира во предефинирана категорија. За таа цел се користи дијаграм на тек базиран на сет од прашања со да/не одговори, кои директно ја дефинираат категоријата на настанот.

ФАЗА ЗА КЛАСИФИЦИРАЊЕ

земајќи ја во предвид стратегијата, настанот се класифицира во една од следниве категории: инцидент, некритично остапување и критично остапување.

ФАЗА НА ОБРАБОТКА

врз основа на категоријата во која е класифициран настанот, се превземаат следниве мерки: *Инцидент*: ако настанот е класифициран како “Инцидент” е затворен со опишување на мерките потребни за решавање на истиот. *Некритични остапувања*: податоците за остапувањето на процесот се земаат предвид за да се види колку пати се има случено остапувањето. Ако сè уште не е надминат дозволеният број на повторувања, настанот останува во категоријата на некритични отстапувања (мали и поголеми).

Критични остапувања: настанот се вбројува во оваа категорија:

- » Кога одговорите од дијаграмот на одлучување посочуваат на “критична девијација”
- » Ако првично е класифициран како “некритична”, но ги има надминато максималниот број на повторувања.

РЕЗУЛТАТИ

Во рамките од една година, следени и анализирани се девијациите за медицинските помагала - рентген филмови и концентрирани раствори за хемодијализа во Производство на медицински помагала во Алкалоид АД. Типовите на несусогласености за готов производ на рентген филмови и концентрирани раствори за хемодијализа се класифицирани во бројни категории (а-м). Девијациите се оценети како инциденти и некритични (мали и поголеми). Девијациите кои се во врска со условите на средината во производниот погон и местото на чување се класифицирани како инциденти. Девијациите кои се во врска со готовиот производ на рентген филмови и концентрираните раствори за хемодијализа се класифицирани како некритични (мали и поголеми). Спроведените мерки вообичаено го намалуваат ризикот на прифатливо ниво. Постојат корективни и превентивни мерки погодни за соодветните девијации. Овие корективни мерки придонесуваат за намалување или отстранување на одреден ризик за производот и неговата примена. Крајното одбрување на затворената девијација ја врши Обезбедување на квалитет пред ослободување на серија производ.

ЗАКЛУЧОК

Овој апстракт ја опишува употребата на анализа на ризик како алатка за управување со девијациите во рамките на фармацевтското производство. Овој метод употребува дијаграм на тек, со кој се одредуваат и класифицираат девијациите преку нивното влијание на квалитетот на производот, врз основа на дефинициите содржани во ICH Q7A.

Со целосно воведување на информациите обновени во основната ризик анализа за процесот, познавањето на процесот може постајано да се подобрува во однос на: *критични точки*: предефинирање на контролните граници; *критичните својства* за квалитет на производот и како истите соодветствуваат на процесните параметри; *податоци за капацитетот на производот*; *ефикасноста на мерките во системот за КМ/ПМ*. Овој пристап овозможува да се постапува ефективно со девијациите, намалување на ресурсите потребни за елиминирање на неважните инциденти и овозможува проактивен пристап за постојано подобрување.

РЕФЕРЕНЦИ

ICH Q9, ICH Q10, ICH Q7A
EC Directive 93/42/EEC of June 14,1993 and amended M5
21 CFR part 211 requirements regarding deviations and role of quality unit

EFFECTS OF FORMULATION VARIABLES ON THE PARTICLE SIZE AND VIABILITY OF L.CASEI - LOADED IN WHEY PROTEIN-CA-ALGINATE MICROPARTICLES

Katarina Smilkov¹, Tanja Petreska Ivanovska², Lidija Petrusavska Tozi², Anita Grozdanov³, Marija Glavas Dodov², Nikola Geskovski², Rumenska Petkovska², Kristina Mladenovska²

¹Faculty of Medical Sciences, Goce Delčev University, Štip, R. Macedonia,

²Faculty of Pharmacy, Ss. Cyril and Methodius University, Skopje, R. Macedonia,

³Faculty of Technology and Metallurgy Ss. Cyril and Methodius University, Skopje, R. Macedonia

The health benefits of the probiotics are becoming more recognized and utilized nowadays. Among lactic acid bacteria, *Lactobacillus casei* has been found to colonize human GIT and exert many health benefits. In general, probiotic cells are very susceptible to harsh conditions and various approaches have been used to improve their viability and to reduce cell damage and loss of viability during processing and storage (1, 2). By adopting improved methods to enhance the survival and stability of bacteria by means of biopolymeric structures, an increased delivery of viable cells can be achieved (3, 4). Among the biopolymers used as coating agents, alginate and whey proteins appear as potential candidates since they are entirely biodegradable and used in many types of food. (4) A new approach in combination of emulsion method and subsequent coating was used in order to reduce cell damage during processing and increase the final cell count. The aim of this work was to evaluate the influence of the formulation variables of *L. casei*-loaded whey protein-Ca-alginate microparticles on the particle size and the survival of the mentioned probiotic during the processing.

MATERIALS AND METHODS

The probiotic culture, *Lactobacillus casei* 01, freeze-dried, was purchased from Chr. Hansen, Denmark. As encapsulating agent, alginate-LF 10/60 (Protanal, FMC Bio-polymers, UK) was used. For the emulsion method of microencapsulation, olive oil (Sigma Aldrich, USA) containing 0,2% Tween 80 (Merck, Germany) was used. The cross-linking of the microparticles was performed by CaCl₂ solution. For additional coating of the microparticles, native solution of commercially available 100% hydrolyzed whey protein isolate (Dymatize Nutrition, USA) was used.

Emulsion technique was applied to aqueous dispersion of alginate and *L. casei* (10ml) in olive oil (40ml) containing 0,2% Tween 80 to obtain spherical particles, which were then cross-linked in CaCl₂ solution. Microparticles were subsequently coated with hydrated native whey protein for 1 h, isolated, washed and freeze-dried (-50°C, 0.07 mbar, 24 h, Freeze-Dryer, Labconco, USA).

After the preparation, Ca-alginate and whey protein-Ca-alginate microparticles loaded with the probiotic were immediately measured using a Mastersizer Hydro-2000S, Malvern Instruments Ltd., UK. The survival of the microencapsulated *L. casei* was evaluated in two stages: prior to- and after lyophilisation. The viability of the cells was assessed in dispersion of beads in 0,05M PBS, pH 6,5 and the number of viable cells was obtained using the plate-count method on MRS agar, after serial dilutions in peptone water.

To deduce the influence of the formulation variables, polynomial regression model at 2nd level was used with the experimental matrix of 11 batches. Concentration limits of three variables were alginate (1 and 4% w/w), whey protein (1 and 3% w/w) and CaCl₂ (1 and 5% w/w). The cell load in the initial suspension was ca. 10-11 log₁₀cfu/g.

RESULTS AND DISCUSSION

The particle size obtained was in the range from 36.32-63.10 μm for the Ca-alginate microparticles (Fig. 1a), and 42.78-77.43 μm for the whey protein-Ca-alginate microparticles (Fig. 1b). Overall effects of the formulation variables pointed to the dominant influence of the concentration of whey protein on the particle size followed by the concentration of alginate. Higher concentration of whey protein and alginate in the coating medium resulted in increased particle size. Insignificant influence of the concentration of CaCl₂ was observed. (Fig. 2)

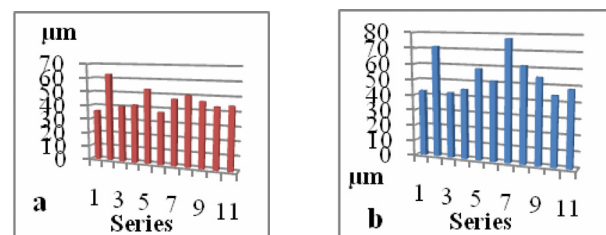


Fig.1: Particle size of *L. casei*-loaded microparticles: a) Ca-alginate, b) whey protein-Ca-alginate microparticles

The survival rate of the probiotic in the whey protein-Ca-alginate microparticles was between 9.30 and 10.78 log₁₀cfu/g, which is in the range from 90.34-99.58% in the particles prior to lyophilisation and between 84.16-98.37% in the particles after lyophilisation (with respect to the initial cell count).

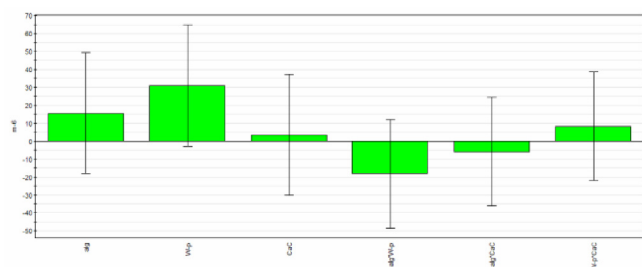
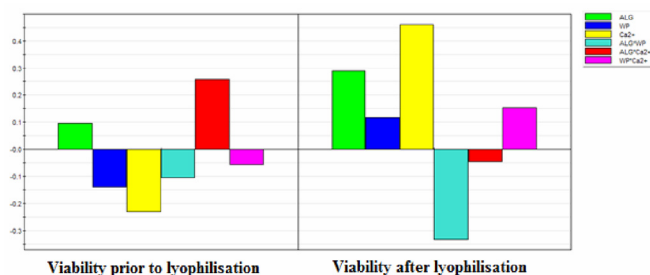


Fig. 2: Effect of the experimental variables on microparticle size.

The data pointed to the dominant influence of the concentration of alginate and CaCl₂ on the viability prior to-, and this trend continues, after lyophilisation. Significant negative effect of the alginate - whey protein interactions on the viability after lyophilisation was observed (Fig. 3), suggesting competition of the polymers and the probiotic for the same bonding sites.

Fig. 3: Effect of the experimental variables on the viability of *L. casei* during processing.



CONCLUSION

In conclusion, *L. casei* loaded whey protein-Ca-alginate microparticles were prepared with survival rate of the probiotic above the minimum therapeutic dose of 10⁷-10⁹cfu/g per day and particle size distribution suitable for the delivery of the probiotic to the lower intestine.

REFERENCES

1. Capela, P., Hay, T.K.C., Shah, N. P. Effect of homogenization on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria, *Food Res. Int.* 2007; 40: 1261-1269.
2. Mandal, S., Puniya, A. K., Singh, K.: Effect of alginate concentration on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298, *Int. Dairy J.* 2006; 16: 1190-1195.
3. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H.: Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt, *Int. Dairy J.* 2003; 13: 3-13.
4. Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S., Marchioni, E.: Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins, *Int. J. Food Microbiol.* 2009; 129: 103-105.
5. Kitabatake, N., Kinekawa, Y.I... Digestibility of bovine milk whey protein and β -lactoglobulin in vitro and in vivo. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46 (12): 4917-4923.

ПРОТЕИН-СА-АЛГИНАТНИ МИКРО-ЧЕСТИЧКИ СО *L. CASEI* -ЕФЕКТ НА ФОРМУЛАЦИСКИТЕ ПРОМЕНЛИВИ ВРЗ ВИТАЛНОСТА И ГОЛЕМИНАТА

Катарина Смилков¹, Тања Петреска Ивановска², Лидија Петрушевска Този², Анита Грозданов³, Марија Главаш Додов², Никола Гешковски², Руменка Петковска², Кристина Младеновска²

¹Факултет за медицински науки, Универзитет Гоце Делчев, Штип, Р. Македонија,

²Фармацевтски факултет, Универзитет Св Кирил и Методиј, Скопје, Р. Македонија,

³Технолошко-металуршки факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје, Р. Македонија

Во светот, сè повеќе се препознаваат и користат ефектите на пробиотиците врз здравјето. *Lactobacillus casei* колонизира во ГИТ на човекот покажувајќи многу поволни ефекти врз здравјето. Меѓутоа, пробиотиците се многу чувствителни на екстремни услови и постојат различни пристапи за подобрување на нивната виталност, за намалување на клеточните загуби и избегнување на оштетувања во текот на преработката и чувањето (1, 2). Примената на нови методи за зголемување на преживувањето на бактериите, со користење на биополимери, овозможува стабилност во услови на производство и испорака на поголем број витални клетки (3, 4). Од биополимерите, алгинатот и сурутскиниот протеин се потенцијални кандидати, поради биодеградабилноста и применливоста во различни видови на прехранбени производи (4). Во овој труд, користен е специфичен метод за подготовка на микрочестички од алгинат и сурутскин протеин со *L. casei*, со цел заштита и зголемување на виталноста на пробиотикот во услови на производство на финален пробиотски производ, чување и примена. Вршена е евалуација на влијанието на формулациските променливи врз големината на микрочестичките и виталноста на пробиотикот.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

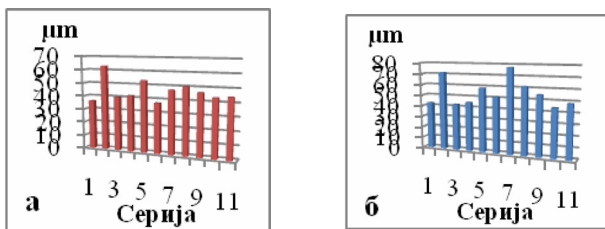
Користена е лиофилизирана култура *Lactobacillus casei* 01, од Chr. Hansen, Данска. Како инкапсулирачки материјали, користен е алгинат, alginate-LF 10/60 (Protanal, FMC Bio-polymers, UK). За методот на микроинкапсулирање со емулгирање користено е маслиново масло (Sigma Aldrich, USA) кое содржи 0.2% Tween 80 (Merck, Germany). Вкрстеното поврзување на честичките е извршено со раствор од CaCl₂. Дополнителното обложување на микрочестичките е со нативен раствор на комерцијално достапен 100% хидролизиран изолат од сурутскин протеин (Dymatize Nutrition, USA).

Со емулгирање на водена дисперзија на алгинат и *L. casei* (10ml) во маслиново масло (40ml) со 0.2% Tween 80 добиени се сферични честички, кои потоа вкрстено се вмрежуваат во раствор на CaCl₂. Честичките дополнително се обложуваат во раствор на нативен сурутскин протеин во тек на 1 ч., се одвојуваат, промиваат и лиофилизираат (-50°C, 0.07 mbar, 24 h, Freeze-Dryer, Labconco, USA). Веднаш после подготовката, честичките од Ca-алгинат и сурутскин протеин-Ca-алгинат се мерат со помош на Mastersizer Hydro-2000S, Malvern Instruments Ltd., UK. Преживувањето на *L. casei* во текот на производство е следено пред и после лиофилизација, во дисперзија на клетките во 0.05M фосфатен пуфер (pH 6.5), после сериски

разредувања во пептонска вода и засадување на MRS агар. За оценка на влијанието на формулациските променливи врз одговорите користен е полином регресионски модел на второ ниво, со експериментална матрица од 11 серии. Концентрациските ограничувања се: алгинат (1 и 4% *m/m*), суруткин протеин (1 и 3% *m/m*) и CaCl₂ (1 и 5% *m/m*). Бројот на клетки во почетната суспензија е од 10⁷-11 log₁₀cfu/g.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

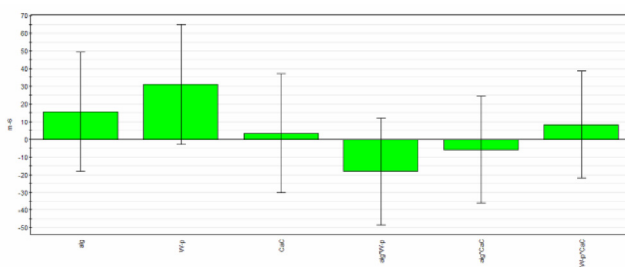
Големината на Ca-алгинатните честички се движи од 36.32 до 63.10 μm (Сл. 1а), а на суруткин протеин-Ca-алгинатните честички од 42.78-77.43 μm (Сл. 1б). Се забележува доминантно влијание на концентрацијата на суруткиниот протеин врз големината на честичките, следено од концентрацијата на алгинатот. (Сл. 2)



Сл. 1: Големина на микрочестички со *L. casei*: а) Ca-алгинат; б) суруткин протеин-Ca-алгинат

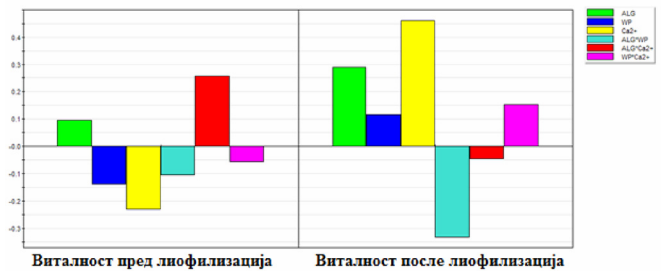
Поголема концентрација на алгинат и суруткин протеин резултира со поголеми честички. Влијанието на концентрацијата на CaCl₂ е незначително.

Преживувањето на *L. casei* во микро-честичките е помеѓу 9.30 и 10.78 log₁₀cfu/g, односно 90.34-99.58% пред лиофилизација и помеѓу 84.16-98.37% после лиофилизација (во однос на иницијалниот број на клетки).



Сл. 2: Влијание на формулациските променливи врз големината на честичките

Забележано е доминантно влијание на концентрацијата на алгинат и CaCl₂ врз виталноста пред и после лиофилизација. Се забележува негативен ефект на интеракцијата суруткин протеин-алгинат врз виталноста после лиофилизација (Сл. 3), веројатно поради конкурентност на полимерите и пробиотикот за исти врзивни места.



Сл. 3: Влијание на формулациските променливи врз виталноста на *L. casei* во текот на производството.

ЗАКЛУЧОК

Подготвени се микрочестички од суруткин протеин-Ca-алгинат со *L. casei*, во кои виталноста на пробиотикот е над терапевтскиот минимум од 10⁷-10⁹cfu/g, а големината на честичките соодветна за испорака во долниот интестинум.

ЛИТЕРАТУРА

1. Capela, P., Hay, TKC., Shah, NP. Effect of homogenization on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria, Food Res. Int. 2007, 40: 1261-1269
2. Mandal, S., Puniya, A. K., Singh, K.: Effect of alginate concentration on survival of microencapsulated Lactobacillus casei NCDC-298, Int. Dairy J. 2006; 16: 1190-1195
3. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H.: Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt, Int. Dairy J. 2003; 13: 3-13.
4. Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S., Marchioni, E.: Microencapsulation of Lactobacillus plantarum spp in an alginate matrix coated with whey proteins, Int. J. Food Microbiol 2009; 129: 103-105.
5. Kitabatake, N., Kinekawa, Y.I., Digestibility of bovine milk whey protein and β-lactoglobulin in vitro and in vivo. J. Agric. Food Chem. 1998; 46 (12): 4917-4923.

QUALIFICATION AND PROCESS VALIDATION ON BLISTER PACKAGING LINE

Maja Stojevaska, Biljana Pavicevic, Sonja Sterjevaska, Darko Atanasoski, Biljana Nanova, Milkica Gligorova

Alkaloid AD Skopje, Blvd. Aleksandar Makedonski 12, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

INTRODUCTION

Qualification is the documented evidence that the equipment works efficiently and generates the expected results.

Process validation is the documented evidence that the process, operated within established parameters, can perform effectively and reproducibly and produces a product meeting its predetermined specifications and quality attributes.

OBJECTIVES

Aim of this work is to qualify the equipment for blister packaging and to perform a process validation on a blister packaging line.

DESCRIPTION

The packaging process on the blister line IMA C80/A81 with HAPA 729 and the packaging process consists of: adjustment of PVC and Alu foil, filling the recipient with bulk product, Alu foil printing, nests forming, filling tablets into blisters, blister sealing, printing of batch number and expiry date on the blisters, blisters perforating, blisters cutting, leaflets folding, cardboard opening, insertion of proper

number of blisters and leaflet, printing of batch number and expiry date on the cardboard boxes, closing of the cardboard boxes, weight checking, overwrapping, final packaging in collective packs.

INSTALLATION QUALIFICATION

The documented verification that the facilities, systems and equipment, as installed or modified, comply with the approved design and the manufacturer's recommendations.

OPERATIONAL QUALIFICATION

The documented verification that the facilities, systems and equipment as installed or modified, perform as intended throughout the anticipated operating ranges.

PERFORMANCE QUALIFICATION

The documented verification that facilities, systems and equipment, as connected together, can perform effectively and reproducibly to produce a medicinal product meeting its predetermined specifications and quality attributes.

PRODUCT CHARACTERISTICS

Aldizem 60 mg are white round biconvex tablets with bisection line on one side with dimensions: diameter 9 mm, height 3,9-4,1 mm, packaging format JZ3. Aldizem 60 mg uses transparent rigid PVC film 250µm. Torvex 80 mg are white oblong biconvex film coated tablets with a bisection line on one side, with dimensions: 20 mm x 8 mm, height 3,9-4,1 mm, packaging format JZ2. Torvex 80 mg uses transparent PVC/PVDC film (120 g/m² PVDC). PVDC-coating gives the foil very high water vapour barrier.

Validation of the packaging process includes a description of the phases of the packaging, and equipment parts that are tested for proper operation, determination of critical process parameters, a description of the tests performed, in-process controls, acceptable criteria, frequency and the quantity of the samples for process controls. Methods for performing the tests are pre-determined in the SOPs. For successfully performing the tests in the process validation, all measuring instruments of the equipment are calibrated, all the packaging materials comply with quality specifications, all the operators and maintenance personnel are trained, and adequate SOPs are followed.

DETERMINATION OF THE CRITICAL TESTS OF THE EQUIPMENT

- » Test for detection of tablet presence in the blister with Laetus camera;
- » Test for detection presence of splicing on Alu foil;
- » Test for detection presence of splicing on PVC or PVDC foil;
- » Test for detection of positioning of Alu foil on the PVC or PVDC foil (lidding foil print registration);
- » Test for pharma code reading on the boxes;
- » Test for pharma code reading on the leaflet;
- » Test for detector checking for leaflet presence;
- » Test for weight check.

RESULTS

Results of the tests are shown in final validation report. All tests in the IQ, OQ, PQ are performed successfully.

CONCLUSION

The packaging process on the blister line IMA C80/A81 with HAPA 729 is capable to perform effectively and reproducibly and produces a product meeting its predetermined specifications and quality attributes.

REFERENCES

- Manufacturer's qualification documentation PIC/S, Recommendations on Validation Master Plan, Installation Qualification, Operational Qualification, Non Sterile Process Validation, Cleaning Validation, PI- 006-2, (July 2004), <http://www.picscheme.org>
- European Commission, 2001, Qualification and validation, Final version of Annex 15 to the EU guide to good manufacturing practice.
- Berry, I. & Nash, R., 1993. Pharmaceutical process validation. 2nd edition. Marcel Dekker, Inc., NY, USA.
- R. Pilchik, "Pharmaceutical Blister Packaging, Part I: Rationale and Materials," Pharm. Technol. 24 (11), 68-78 (2000).

КВАЛИФИКАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА НА ПРОЦЕС НА ПАКУВАЊЕ НА ОПРЕМА ЗА БЛИСТЕР ПАКУВАЊЕ

Маја Стојевска, Биљана Павиќевиќ, Соња Стерјевска, Дарко Атанасоски, Биљана Нанова, Милкица Глигорова

АД Алкалоид, Скопје

ВОВЕД

Квалификација на опрема за блистер пакување преставува документирана евиденција дека опремата работи ефикасно и ги дава очекуваните резултати. Валидација на процес на пакување преставува документирана евиденција дека процесот, кој работи во дефинираните параметри, е способен конзистентно да дава производи со репродукцибилен квалитет, кои се совпаѓаат со регулаторните спецификации и атрибути за квалитет.

ЦЕЛ

Целта на овој труд е квалификација на производна опрема за блистер пакување и валидација на процесот на пакување на истата.

ОПИС

Процесот на пакување на опремата IMA C80/A81 со HAPA 729 се состои од следните фази: подесување на PVC и алуминиумска фолија, полнење на рецепиентот со полупро-извод, формирање гнезда на PVC филм, полнење таблети во формиран PVC филм, печатење на алуминиумска фолија, лепење на PVC и алуминиумска фолија и формирање блистер, печатење сериски број и рок на траење на блистер, перфорирање и сечење на блистери, превиткување упатства, отворање кутии, внесување соодветен број блистери и упатство во кутија, печатење сериски број и рок на траење на кутија, затворање на кутии, проверка на маса на катула, обвиткување катули во полиетиленска фолија, пакување во збирна кутија според норматив.

ИНСТАЛАЦИОНА КВАЛИФИКАЦИЈА

Инсталационата квалификација има за цел да докаже дека опремата е правилно и соодветно инсталирана во согласност со дизајнот,

цртежите, спецификациите, спецификацијата од производителот на опремата и важечките прописи.

ОПЕРАТИВНА КВАЛИФИКАЦИЈА

Целта на оперативната квалификација е да покаже дека опремата функционира во согласност со спецификациите на производителот.

ПЕРФОРМАНСНА КВАЛИФИКАЦИЈА

Со перформансната квалификација се докажува дека опремата дава производи со репродукцибилен квалитет кога работи во границите на зададените спецификации

КАРАКТЕРИСТИКИ НА ПРОИЗВОДИТЕ

Aldizem 60 mg се бели округли биконвексни таблети со разделна линија од едната страна со димензии: дијаметар 9 мм, висина 3,9 - 4,1 мм, гарнитура за пакување JZ3. Aldizem 60 mg се пакува во PVC фолија (250µm).

Torvex 80 mg се бели долгнавести биконвексни филм обложени таблети со разделна линија од едната страна, со димензии: 20 мм x 8 мм, висина 5,1-5,5 мм, гарнитура за пакување JZ2. Torvex 80 mg се пакува во PVC/PVDC фолија (120 g/m² PVDC). Како резултат на обложувањето на PVC фолијата со PVDC филм фолијата има многу поголеми бариерни својства за пропустливост на влага.

Валидацијата на процесот на пакување вклучува опис на фазите на пакување и деловите од опремата кои се тестираат за исправно работење, детерминирање на критичните процесни параметри кои се тестираат, опис на тестовите кои се изведуваат, ин-процес контроли, прифатливи критериуми, фреквенција и количина на мостри за процесните контроли. Методите за изведување на тестовите се во согласност со СОП-ови. За успешна изведување на тестовите при валидацијата калибрирани се критичните мерни инструменти на опремата, амбалажните компоненти одговараат на спецификациите на квалитет, операторите и сервисерите се обучени за работа, се следат соодветните СОП -ови за работа.

ДЕТЕРМИНИРАЊЕ НА КРИТИЧНИТЕ ПАРАМЕТРИ ЗА ТЕСТИРАЊЕ

- » Тестирање на работата на Laetus ка-мера;
- » Тестирање на снимање на спојување на Al фолија;
- » Тестирање на снимање на спојување на PVC или PVC/PVDC фолија;
- » Тестирање на позиционирање на Al фолија врз PVC или PVC/PVDC фолија;
- » Тестирање на читање на фармакод на кутија;
- » Тестирање на снимање на фармакод на упатство;
- » Тестирање на функцијата на детекторот за присуство на упатство во кутија;
- » Тестирање на машина за проверка на маса на катула.

РЕЗУЛТАТИ

Резултатите од тестирањата се прикажани во финален валидационен извештај. Сите тестови во IQ, OQ, PQ се изведени успешно.

ЗАКЛУЧОК

Процесот на пакување е способен конзистентно да дава производи со репродукцибилен квалитет, кои се совпаѓаат со регулаторните спецификации и атрибути за квалитет.

ЛИТЕРАТУРА

- Manufacturer's qualification documentation PIC/S, Recommendations on Validation Master Plan, Installation Qualification, Operational Qualification, Non Sterile Process Validation, Cleaning Validation, PI- 006-2, (July 2004), <http://www.picscheme.org>
- European Commission, 2001, Qualification and validation, Final version of Annex 15 to the EU guide to good manufacturing practice.
- Berry, I. & Nash, R., 1993. Pharmaceutical process validation. 2nd edition. Marcel Dekker, Inc., NY, USA.
- R. Pilchik, "Pharmaceutical Blister Packaging, Part I: Rationale and Materials," Pharm. Technol. 24 (11), 68-78 (2000).

INFLUENCE OF EXCIPIENTS ON IN-PROCESS PARAMETERS ON METRONIDAZOLE TABLETS

Meri Davceva

Alkaloid AD, Blvd Aleksandar Makedonski 12, Skopje, Macedonia

INTRODUCTION AND AIM

Metronidazole belongs to the class of imidazole and has been classified as an antiprotozoal and antibacterial drug. The most important criteria for tablet formulation design is being considered - *achieving the desired dissolution of the active pharmaceutical ingredient, i.e. the ability for absorption from the dosage form according to intended use for immediate release.*

Metronidazole resides in Class I API of the Biopharmaceutics Classification System, API with high permeability and high solubility. That's why we focused on the physical tablet properties, evaluating the influence of excipients on in-process parameters on Metronidazole tablets.

METHODOLOGY

The study was performed in *Production of solid dosage forms* and R&D departments in Alkaloid, Skopje. Direct compression was chosen because it is a more efficient method for preparation of immediate release tablets. The components were first sieved through 0,8 mm sieve, then mixed in ERWEKA drum PM 5. The tableting was performed on a rotary press Fette Perfecta 2, using 12 mm biconvex punches. The starting point was the following rule: *the less involved the excipients are, the better the formulation is.* Five formulations were prepared in which microcrystalline cellulose (Avicel PH 101), was the main diluent beside the active ingredient and the required lubricants. In the other formulations a binder, polyvinylpyrrolidone (Kollidon K-25), was added in the same concentration (1 %). The last three formulations contained disintegrant, the cross-linked polyvinylpyrrolidone (Kollidon CL), in various concentrations (0,2 ; 0,7 and 1,2 %).

The parameters for evaluating the tablets were:

- » hardness – determined by Erweka tablet hardness tester TBH 300 MD,
- » mechanical strength – determined by the tablet-crushing strength (got by the hardness and the dimensions of the tablet) according to Fell and Newton's method,
- » friability – determined by Erweka friability tester TAR 100 and
- » disintegration time – determined by Erweka disintegration tester type ZT .

RESULTS

In general the prepared tablets from all formulations showed appropriate mechanical strength, hardness, friability and disintegration time. In the formulation where only the microcrystalline cellulose was included, it functioned as a superior diluent with the role of a binder and a disintegrant. The involvement of the binder (Kollidon K-25), in the next formulation, resulted in tablets with bigger mechanical strength, hardness and friability, but with prolonged disintegration time. The role of the disintegrant, Kollidon CL, in the formulation where it is involved is obvious. It decreases the disintegration time 4 – 12 times, depending on its concentration.

CONCLUSION

The evaluated excipients in the metronidazole tablets, have significant influence on physical properties of the hard compact. The presence of the binder contributes to the achievement of higher hardness and mechanical strength, but increases the disintegration time. The disintegrant has a remarkable influence on the disintegration time performing rapid disintegration and dissolution, but it decreases the hardness of the tablets.

The influence of the excipients, alone or in interaction with one another, will be evident and more precisely determined with optimization of this formulation.

REFERENCES

1. Amidon G. L. Lennernas H., Shah V.P., et al. A Theoretical basis for a Biopharmaceutical Drug Classification, Pharm Res. 1995 March;12(3):412-20.
2. Augsburger, L. Larry and Zellhofer, J. Mark, Tablet formulation Encyclopadia of Pharmaceutical Technology, Second edition, Vol.3 Marccel Dekker, 2002
3. Herbert A. Lieberman, Leon Lachman, Pharmaceutical dosage forms, Tablets Marcel Dekker, Vol.1.(289-337)
4. Itiola O A, Pilpel N. Formulation effects on the mechanical properties of Metronidazole tablets J. Pharm Pharmacol, 1991 March;43(3):145-7
5. Zhang, Y., Law, Y, and Chakrabarti, S., 2003, Physical properties and compact analysis of commonly used direct compression binders, AAPS Pharm Sci Tech 2003, 4(4) article 62

ВЛИЈАНИЕТО НА ЕКЦИПИЕНСИТЕ ВРЗ ИН ПРОЦЕС ПАРАМЕТРИ НА МЕТРОНИДАЗОЛ ТАБЛЕТИ

Мери Давчева

АД Алкалоид, бул. Александар Македонски бр 12, Скопје, Р. Македонија

ВОВЕД И ЦЕЛ

Метронидазолот припаѓа на класата имидазоли и е карактеризиран како антипротозоен и антибактериски агенс. Земен е во обзир најважниот критериум за дизајн на таблетна формулација - постигнување на оптимална дисолуција на лекот, односно можност за абсорпција од дозата форма согласно саканата употреба за брзо ослободување.

Метронидазолот припаѓа на првата група на супстанции според биофармацевтскиот класификационен систем, лесно растворливи и високопермеабилни супстанции. Затоа се насочивме кон физичките карактеристики на таблетите, со цел утврдување на влијанието на екципиенсите врз ин процес параметрите на Метронидазол таблети.

МЕТОДИ

Истражувањето е направено во одделите Производство цврсти форми и Р&Д, Алкалоид Скопје. Избрана е директната компресија како поефикасен метод за припрема на таблети со брзо ослободување. Претходно просеаните компоненти на сито 0,8 mm се мешаат во буре хомогенизатор, ERWEKA тип PM 5. Таблетирањето е изведено на ротациона таблет машина Fette – Perfecta 2, со клипови со биконвексни површини, дијаметар 12 mm. Тргнавме од правилото што помалку вклучени екципиенси, тоа е подобра формулацијата. Припремени се пет формулации во кои микрокристалната целулоза (Avicel PH 101), е основниот полнител покрај активната супстанца и потребните лубриканси.

Во останатите формулации вклучен е врзувач, коповидон (Kollidon K-25), во иста непроменлива концентрација (1%). Последните три формулации содржат дезинтегранс, кросповидон (Kollidon CL), во различна концентрација (0,2 ; 0,7 и 1,2 %).

Параметри за проценување на таблетите беа:

Цврстина – одредувана со Erweka tablet hardness tester TBH 300 MD, Механичка јакост – одредувана од силата на кршење на таблетите (изразена преку цврстината на таблетите) и димензиите на таблета-та, по метода на Fell и Newton,

Фријабилност – одредувана со Erweka friability tester TAR 100 и

Време на дезинтеграција - одредувано со Erweka disintegration tester type ZT .

РЕЗУЛТАТИ

Генерално гледано од сите формулации добивме таблети со задоволителна механичка јакост, цврстина, фријабилност и време на распаѓање. Во формулацијата каде е вклучена само микрокристалната целулоза, таа се јавува како супериорен полнител со улога на врзувач и дезинтегранс. Вклучувањето на врзувачот (Kollidon K-25), во следните формулации резултира во таблети со поголема механичка јакост, цврстина и фријабилност, но продолжено време на распаѓање. Јасно се забележува улогата на дезинтегрансот (Kollidon CL), во формулациите во кои е вклучен. Тој го намалува времето на распаѓање од 4 - 12 пати, пропорционално со неговата застапеност.

ЗАКЛУЧОК

Испитуваните екципиенси во формулациите на метронидазол таблети, имаат значајно влијание врз физичките карактеристики на цврстиот компакт. Присуството на врзувачот овозможува постигнување поголема цврстина и механичка јакост, но го зголемува времето на дезинтеграција. Дезинтегрансот има забележително влијание на времето на распаѓање, овозможувајќи брза дезинтеграција и брза дисолуција, но ја намалува цврстината на таблетите. Попрецизно утврдување на влијанието на екципиенсите, поединечно и во интеракција, ќе даде оптимизација на оваа формулација.

ЛИТЕРАТУРА

1. Amidon G. L. Lennernas H., Shah V.P., et al. A Theoretical basis for a Biopharmaceutical Drug Classification, Pharm Res. 1995 March;12(3):412-20.
2. Augsburger, L. Larry and Zellhofer, J. Mark, Tablet formulation Encyclopadia of Pharmaceutical Technology, Second edition, Vol.3 Marccel Dekker, 2002
3. Herbert A. Lieberman, Leon Lachman, Pharmaceutical dosage forms, Tablets Marcel Dekker, Vol.1.(289-337)
4. Itiola O A, Pilpel N. Formulation effects on the mechanical properties of Metronidazole tablets J. Pharm Pharmacol, 1991 March;43(3):145-7
5. Zhang, Y., Law, Y, and Chakrabarti, S., 2003, Physical properties and compact analysis of commonly used direct compression binders, AAPS Pharm Sci Tech 2003, 4(4) article 62

PROCESS CAPABILITY INDEXES DETERMINATION DURING THE VALIDATION OF THE TABLETS PRODUCTION PROCESS

Violeta Dinić Milisavljević¹, Nataša Anevska Stojanovska², Sonja Ugarković², Marija Glavaš Dodov³

¹Alkaloid d.o.o. Beograd,

²Alkaloid AD Skopje,

³Faculty of Pharmacy, University Ss Cyril and Methodius, Skopje

The prime objective of any pharmaceutical plant is to manufacture products of requisite attribute and quality consistently, at the lowest possible cost. Although validation studies have been conducted in the pharmaceutical industry for a long time, there is an ever-increasing interest in validation owing to their industry's greater emphasis in recent years on quality assurance and productivity improvement. Validation is a necessary part of a quality assurance program and is fundamental to an efficient production operation. USFDA defines validation as "Establishing documented evidence, which provides a high degree of assurance that specific process will consistently produce a product meeting its predetermined specifications and quality. The most compelling reason for validation is to guarantee, as far as possible, that all processes and machinery in the pharmaceutical manufacturing process are being used in a way, which will ensure safety, integrity, quality and strength of a dosage form.

Validation requires documented evidence that a process consistently conforms to requirements and then to carry out studies demonstrating that this is the case. Statistical tools can aid in both tasks. Statistical tools can enhance process understanding and foster innovative approaches to process validation and pharmaceutical development. Among the statistical tools, the process-capability indices (Cp and Cpk) measure the process's ability to manufacture products that meet specifications and requirements. Usually, specifications have upper specification limit (USL) and lower specification limits (LSL). Sometimes, as in a case of dissolution studies, there is only one specification limit.

Process capability indexes can be estimated:

$$C_p = (USL - LSL) / 6s$$

$$C_{pk} = \min [x - LSL / 3s, USL - x / 3s]$$

where \bar{x} , stands for an average value and s for standard deviation.

The purpose of the present study was to establish documented evidence which provides a high degree of assurance that manufacturing process of AB tablets 20/25 mg will consistently produce the product meeting its pre-determined specifications and quality attributes.

Validation of the manufacturing process of AB tablets 20/25 mg was performed according to the previously approved validation protocol where the method of production, equipment used, process controls and finished product specification limits, critical steps, sampling plan and acceptance criteria were described.

Validation study has been performed on three consecutive batches. AB tablets 20/25 mg have been manufactured with the method of wet granulation. All three batches have been manufactured under the same conditions and there were no process changes during the period. Frequent control tests assured that appropriate reproducibility has been achieved.

The production equipment and analytical method used has been validated prior starting of the tests.

The goal of the data evaluation was to assess the potential process capability index (Cp) and the actual process capability index (Cpk) using the content uniformity and dissolution behavior of AB tablets 20/25 mg.

The obtained values of all manufactured batches for the process capability indexes, Cp and Cpk, using the content uniformity and dissolution behavior of AB tablets 20/25 mg were above 1,3.

Hence, it was concluded that the manufacturing process can be considered capable of producing product meeting the predetermined standards and quality attributes at Alkaloid AD.

REFERENCES

1. John M. Dietrick, Bernard T. Loftus, REGULATORY BASIS FOR PROCESS VALIDATION (Chapter 1), Robert A. Nash (Editor), Alfred H. Wachter (Editor)- PHARMACEUTICAL PROCESS VALIDATION: An International Third Edition (Drugs and the Pharmaceutical Sciences) MARCEL DEKKER INC, 2003.
2. Thomas D. Murphy, Shailesh K.Singh, and Merlin L. Utter, STATISTICAL PROCESS CONTROL AND PROCESS CAPABILITY (3499-3512), James Swarbrick (Editor), ENCYCLOPEDIA OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY, Third Edition, Informa Healthcare USA, 2007.
3. János Pogány, pharmacist, PhD, consultant to WHO, MANUFACTURING PROCESS VALIDATION, SOLID DOSAGE FORMS, Pretoria, South Africa, Supplementary Training Workshop on Good Manufacturing Practices (GMP) , 2005

CONTINUOUS GRANULATION, A NEW APPROACH IN PHARMACEUTICAL MANUFACTURING

Emilija Spaseska Aleksovska, Aleksandar Aleksovski, Emina Zahirovic

ZADA pharmaceuticals, Bosnia and Hercegovina

In recent years, continuous processing has gained importance in the pharmaceutical industry, evidenced by the prevalence of seminars and conferences discussing this topic, as well as the increasing number of installations. Regulatory bodies have also elicited a large interest in moving to continuous processing as a method to improve the quality and efficiency of pharmaceutical production. In recent years, speakers from the FDA have held presentations at numerous conferences and seminars, discussing the advantages of continuous processing using Quality by Design and PAT philosophy (1,4,5,6).

Continuous equipment for the production of pharmaceutical granules is not new; it has been around for many years (often adapted from equipment for the food or chemical industry). These early systems, however, had major drawbacks that made them impractical for the pharmaceutical industry as high waste at start-up and shut-down. R&D on these systems was often difficult; the systems had issues with plug flow, were not easily cleanable and could not be used as flexible R&D equipment(2,4).

A new generation of continuous production equipment overcomes these problems and ensures no – or only minimal – waste at start-up and shut-down.

According to the FDA, manufacturing without interruption with a constant flow of materials fits very well within the concept of QbD because it is more modern manufacturing approach, potential to improve assurance of quality and consistency of drugs and enables quality to be directly built into process design. It provides many opportunities to adjust the process to meet the critical quality attributes and thus patient safety (2, 8, 9).

No specific regulations or guidance for continuous manufacturing, other than the definition of "lot". Nothing in regulations or guidance prohibiting continuous manufacturing (1,6).

What is also very important for this new approach is that during the continuous process different methods and procedures can be used for in process control:

- » Spectroscopic methods (NIR, FTIR, Raman) for concentration/ assay analysis of APIs and excipients
- » Laser light scattering for particle size distribution
- » NIR for moisture content during drying process
- » NMR for weight detection
- » In-line GC for solvent content

ConsiGma™, a revolutionary continuous high shear granulation and drying system installed in ZADA pharmaceuticals is manufactured by GEA Pharma Systems nv - Collette™, manufacturer of the state-of-the-art machines used in pharmaceutical production. ConsiGma™ continuous granulation line was developed in concurrence with the FDA's QbD initiative and was designed to satisfy the industry's need for continuous production to provide improved quality, flexibility and consistency for pharmaceutical processes.

The system is designed in such a way that both R&D and production can use the same size of equipment, thus eliminating scaleup.

Further advantages are a higher yield and very stable, plug flow-based processes leading to increased quality levels and higher efficiency.

This scope allows to bring the products to the market faster, in a more flexible and environmentally conscious way.

The main advantages of ConSigma continuous granulation system are (7):

- » Flexible batch size: One ConsiGma™
- » can run 500g in R&D, but can also run clinical trial, launch size, and any production size batches.
- » There is no need for scale-up and fast product development is possible
- » Compact, modular construction with very short installation time, Consistent granule quality with improved compressibility
- » Reduced investment and running costs: reduced space requirements, reduced use of utilities

The scope design provide possibilities to change many parameters till acceptable quality of granulate is obtained.

Parameters that are changeable are:

- » **In the granulator module:** powder flow, granulator speed, granulator configuration, liquid flow, barrel temperature;

In the drying module: quantity of wet granulate (filling time), air flow: air temperature, drying time;

- » **In the calibration module:** mill speed, screen size;

As per our experience with ConSigma we obtained good quality of granulate and further expected quality of solid dosage form, tablets, with a quite wide range of APIs.

We succeed to produce granulate with excellent characteristics, flowability and compressibility, with very bulky powder mixtures, bulk density cca 0,2g/ml, and also with materials with high bulk density 0,9g/ml.

As per our experience future of continuous granulation which can be upgraded with tableting in line with the recent advances in technology, with the quality of products that is obtained, and the endorsement of continuous processing by the FDA, is looking extremely bright.

REFERENCES

1. Christine M. V. Moore, Ph.D. Deputy Director for Science and Policy ONDQA/CDER/FDA; FIP Pharmaceutical Sciences & AAPS Annual Meeting, November 2010
2. F. Pavlou, K. Nepveux, K. Schoeters, A. Weiler, S. Whitfield Continuous Processing: Is The Pharma Industry Finally Coming Round To The Idea?, PTE article, September 1, 2010
3. K. Schoeters, Overcoming The Misconceptions Of Continuous Processing, PTE article February 2011
4. Elaine Morefield PhD Continuous Manufacturing in the Pharmaceutical Industry - An FDA Perspective, NDQA/CDER/FDA ISPE Annual Meeting, November 2009
5. Tarea Gooen, Office of compliance FDA/CDER, ISPE Annual Meeting, November 2009
6. Tarea Gooen, A scientific and Regulatory Perspective: Continuous Manufacturing and cGMP, FDA Continuous Manufacturing Symposium, March 2010
7. K. Schoeters, Continuous Tableting: From Powder to Tablet in 20 Minutes, innovations in Pharmaceutical Technology www.iptonline.com
8. Guidance for Industry, PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance, US Food and Drug Administration, September 2004,
9. www.ipqpubs.com/news/fda-touting-benefits-of-continuous-manufacturing

FORMULATION OPTIMIZATION OF KETO-PROFEN HYDROPHILIC MATRIX SYSTEM BY USING FACTORIAL EXPERIMENTAL DESIGN

H. Litovin, R. Dameska, D. Dimova, E. Adamova, A. Sekovanic, E. Ristevska, M. Anevska, D. Lepcevska, L. Ivceska, E. Dimitrovska, L. Makraduli

Replekfarm, Kozle 188, 1000 Skopje, R. Macedonia

INTRODUCTION

Ketoprofen is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), widely used in order to reduce pain and inflammation caused by several conditions such as osteoarthritis, rheumatoid arthritis and abdominal cramps associated with menstruation. The mechanism of action of ketoprofen is mainly associated to the inhibition of the body's ability to synthesize prostaglandins [1]. Conventional dosage forms of this drug, administered orally, are rapidly and almost completely absorbed from the gastro-intestinal tract, the peak plasma concentrations occurring within 1-3 h. Ketoprofen is an appropriate model drug for formulation of controlled release dosage forms due to its short plasma elimination half-life and poor solubility, which affects its bioavailability. In recent years, the use of hydrophilic polymers, in particular cellulose derivatives, has attracted considerable attention for the development of controlled release technology in the formulation of pharmaceutical products, due to their ability to form gels in aqueous medium [2].

OBJECTIVE

The main objective of this study was to use a factorial experimental design to study the influence of cellulose polymer (type and concentration) on the *in vitro* release profile of ketoprofen from hydrophilic polymer matrices and formulation optimization by using response-surface methodology (RSM).

MATERIALS AND METHODS

Ketoprofen (Wuxue Xunda Pharmaceutical Co., China); hydroxypropylmethylcellulose HPMC 4000 (Methocel®K4M, Colorcon, West Point PA) and HPMC 100 (Methocel®K100 LV, Colorcon, West Point PA); hydrox-

yethylcellulose HEC (Natrosol[®]250 HHX, Aqualon, Germany), lactose monohydrate (Tabletose[®]80, Meggle GmbH, Germany), colloidal silicon dioxide, anhydrous (Aerosil[®]200, Evonic Industries, Germany), talc (Merck, Germany) and magnesium stearate (Mosselman, Belgium). Hydrophilic matrices were prepared by wet granulation. Dissolution test was performed according to USP/NF: apparatus 2 - paddle; medium - buffer solution with pH 7.2; volume - 1000 ml; velocity of mixing - 100 rpm. Samples were analyzed by UV spectrophotometric determination, absorbance wavelength 258 nm. Specification requirements were: max. 25% after 1 h; 20 - 40% after 3 h, 35 - 55% after 6 h, min. 55% released ketoprofen after 8 h. The factorial design was carried out by the software Statgraphics[®] plus (Version 5.1, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

The influence of independent variables (type and concentration of cellulose polymer) was examined by achieving controlled release of ketoprofen according to specified requirements. Independent variables were varied on two levels (coded as 1 and 0) which represented addition or absence of HPMC in the hydrophilic matrix formulation. As shown on table 1, experimental combination 0/0 represents absence of both HPMC polymers and presence of HEC.

Independent variables	Experimental combinations			
	0/1	0/0	1/0	1/1
Conc. of HPMC 2208 4000 cPs (%)	/	/	20	14
Conc. of HPMC 2208 100 cPs (%)	30	/	/	16
Conc. of HEC 250 cPs (%)	/	20	/	/

Table 1. Coded and real values for independent variables

The data obtained from the statistical analysis of variance (ANOVA), show that the factors with the biggest influence on the release profile of the active ingredient were: the type of polymer (HPMC 4000 and HPMC 100) and interaction between the polymers (HPMC 4000 / HPMC 100). From the responses at every stage of the dissolution profile can be seen that all experimental combinations fulfill the criteria for the release of ketoprofen in the 1st and the 4th stage of dissolution profile. Only, formulation containing combination of two cellulose polymers: HPMC 4000 / HPMC 100 release the ketoprofen in the 2nd and the 3rd stage within dissolution profile specified limits. Formulation optimization was made by combining multiple responses from all four stages of the dissolution profile, as shown on the contour graphic plot (Fig. 1). Solid painted part (upper right corner) on the contour plot (Fig. 1) represents optimal formulation with: 14% w/w HPMC 4000 and 16% w/w HPMC 100.

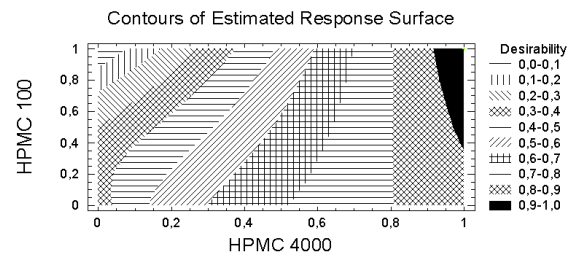


Fig. 1. Contour plot of multiple optimization

The tri-dimensional graph of the surface response (Fig. 2) shows the optimal formulation with respect to d-function. Maximum value obtained for d-function is 0.9 for optimal responses: 10%; 25%; 48% and 64% released ketoprofen after 1, 3, 6 and 8 hours, respectively.

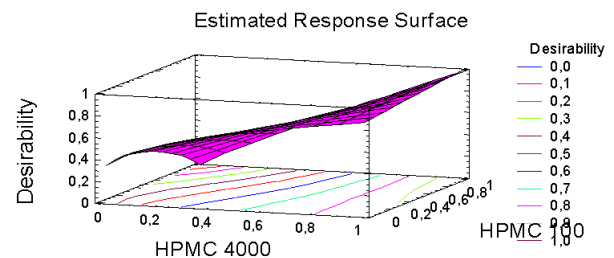


Fig. 2. Response-surface graphic plot showing optimal concentration of hydrophilic polymers which influenced the release of ketoprofen from hydrophilic matrix system

CONCLUSION

By using 2² factorial experimental statistical design, the influence of the type and concentration of hydrophilic polymer on dissolution profile of ketoprofen were examined. Response surface graphs were used and the optimal formulation with ketoprofen release profile according to specified dissolution profile was selected.

REFERENCES

1. Parfitt K. (eds). Martindale: The complete Drug reference 36th ed. The Pharmaceutical Press, London, 2009
2. Habib M.J., Mesue R. Development of controlled release formulations of ketoprofen for oral use. Drug Dev Ind Pharm 1995; 21:1463-1

ОПТИМИЗАЦИЈА НА ФОРМУЛАЦИЈА НА КЕТОПРОФЕН ХИДРОФИЛЕН МАТРИКС СИСТЕМ СО ПРИМЕНА НА ФАКТОРИЈАЛЕН ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН СТАТИСТИЧКИ ДИЗАЈН

Х. Литовин, Р. Дамеска, Д. Димова, Е. Адамова, А. Секованиќ, Е. Ристевска, М. Аневска, Д. Лепчевска, Л. Ивческа, Е. Димитровска, Л. Макадули

Реплекфарм, Козле 188, 1000 Скопје, Р. Македонија

ВОВЕД

Активната супстанција кетопрофен припаѓа во групата на нестероидни антиинфламаторни лекови - НСАИЛ и се применува во терапијата на болка и воспаление предизвикани од следните патолошки состојби: остеоартритис, ревматиден артритис и стомачни грчеви во менструалните периоди. Основниот механизам на делување на кетопрофенот е инхибиција на синтезата на простагландини [1]. Кетопрофенот формулиран во конвенционална фармацевтска дозирана форма, по перорална администрација брзо и комплетно се абсорбира во ГИТ, постигнувајќи максимална плазма концентрација за 1 - 3 h. Краткото полувреме на елиминација и слабата растворливост на кетопрофенот влијаат на неговата биорасполо-живост, а оттука создаваат и погоден кандидат за формулирање во дозирана форма со продолжено ослободување. Во последните години евидентна е сè поголемата употреба на хидрофилни полимери, особено целулозните деривати, во развојот на формулации со продолжено ослободување на активната супстанција [2].

ЦЕЛ

Оптимизација на формулацијата на хидрофилен матрикс систем со продолжено ослободување на кетопрофен со примена на факторијален експериментален статистички дизајн.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Кетопрофен (Wuxue Xunda Pharmaceutical Co., China); хидроксипропил метил целулоза НРМС 4000 (Methocel[®] K4M) и НРМС 100 (Methocel[®] K100 LV, Colorcon, West Point PA); хидроксietил целулоза НЕС (Natrosol[®] 250 ННХ, Aqualon, Germany) лактоза монохидрат (Meggler GmbH, Germany), силициум диоксид колоиден, безводен (Aerosil[®] 200, Evonic Industries, Germany), талк (Merck, Germany) и магнезиум стеарат (Mosselman, Belgium). Хидрофилните матрикс таблети беа приготвени со метод на влажна гранулација. Тестовите на дисолуција (според USP/NF): апарат 2 - метод со весло; во пуфер со рН 7.2; волумен 1000 ml, 100 rpm, а примероците беа анализирани со УВ спектрофотометриско отчитување на 258 nm. Спецификација за растворливост: макс. 25% по 1 h; 20 - 40% по 3 h, 35 - 55% по 6 h, мин. 55% по 8 h.

Статистичката обработка на податоците беше извршена со примена на Statgraphics plus, Windows software program (Version 5.1, USA).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Влијанието на типот и концентрација на хидрофилен полимер беше согледано во насока на постигнување на продолжено ослободување на кетопрофен во рамките на зададената спецификација.

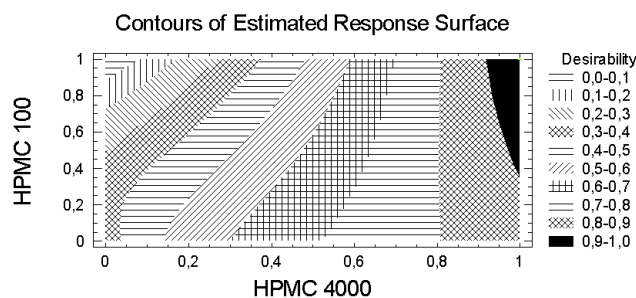
Независните варијабли беа варирани на две нивоа (кодирани како 1 и 0) што означува присуство или отсуство на НРМС во формулацијата. Како што може да се забележи од табелата 1, експерименталната комбинација 0/0 се однесува на отсуство на двата НРМС полимери, а присуство на НЕС.

Табела 1. Кодирани и реални вредности на варијаблите

Независни варијабли	Експериментални комбинации			
	0/1	0/0	1/0	1/1
Конц. на НРМС 2208 4000 cPs (%)	/	/	20	14
Конц. на НРМС 2208 100 cPs (%)	30	/	/	16
Конц. на НЕС 250 cPs (%)	/	20	/	/

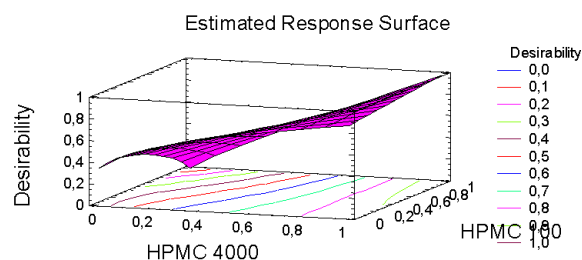
Според извршената анализа на варијанса (АНОВА), статистички значајно влијание имаат двата фактори (НРМС 4000 и НРМС 100) и интеракцијата помеѓу нив (НРМС 4000 / НРМС 100) врз дисолуцискиот профил на кетопрофен.

Оптимизација на формулацијата, земајќи ги во предвид четирите фази на дисолуција, прикажана е како контурен дијаграм на слика 1.



Слика 1. Контурен дијаграм на мултипна оптимизација

На графичкиот приказ обоениот дел (во горниот десен агол) ја претставува оптималната формулација составена од 14% m/m НРМС 4000 и 16% m/m НРМС 100. На слика 2 графички е прикажана оптималната формулација во зависност од d-функцијата. Највисоката вредност на d-функцијата е 0.9 за оптималните вредности на одговорот по изминати 1, 3, 6 и 8 часа: 10%; 25%; 48% и 64% ослободен кетопрофен, соодветно.



Слика 2. Response-surface графички приказ на оптималните концентрации на хидрофилните полимери кои условуваат добивање на матрикс систем со специфицираниот профил на ослободување

ЗАКЛУЧОК

Со примена на 2^2 факторијален експериментален статистички дизајн согледано е влијанието на типот и концентрацијата на хидрофилните полимери врз брзината на ослободување на кетопрофен, а воедно е селектирана и оптималната формулација чиј дисолуциски профил одговара на зададената спецификација за фазна растворливост.

ЛИТЕРАТУРА

1. Parfitt K. (eds). Martindale: The complete Drug reference 36th ed. The pharmaceutical Press, London, 2009
2. Habib M.J., Mesue R. Development of controlled release formulations of ketoprofen for oral use. Drug Dev Ind Pharm 1995; 21:1463-14

FORMULATION AND EVALUATION OF SOLID LIPID NANOPARTICLES LOADED WITH BUDESONIDE FOR DELIVERY TO THE INFLAMED COLONIC MUCOSA

H. Litovin, K. Goracinova, N. Geskovski, M. Simonovska Crcarevska, S. Dimcevska, K. Mladenovska, M. Glavas Dodov

Faculty of Pharmacy, Ss Cyril and Methodius University, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

INTRODUCTION

Ulcerative colitis and Crohn's disease are the major forms of inflammatory bowel disease (IBD), characterized by chronic uncontrolled inflammation of intestinal mucosa. BDS, a potent corticosteroid designed to have location specific delivery to the GIT, is one of the most used drugs in the treatment of active IBD.

However, standard treatment for IBD necessitates the frequent intake of anti-inflammatory drugs, leading to significant adverse events. Therefore, a carrier system able to deliver the drug specifically and exclusively to the inflamed regions for prolonged periods of time after oral administration, would be a distinct improvement on the existing delivery systems and would result in significantly fewer side effects compared to conventional therapy (1).

Solid lipid nanoparticles (SLNs) are under extensive worldwide study as promising alternative drug carriers. SLNs are produced from biocompatible and biodegradable lipid materials, making them a promising therapeutic strategy for drug targeting and delivery. Due to their versatility in loading both lipophilic and hydrophilic molecules in the solid lipid matrix, SLNs depict the ability to prolong, extend or sustain the release of the loaded molecules, therefore reducing the repeated administration, and increasing the therapeutic value of a certain treatment (2).

The aim of this work was to design BDS loaded SLNs with physicochemical and biopharmaceutical properties that will be in favor of efficient local treatment of IBD after peroral administration.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

Cutina GMS V PH^o was kindly donated from Cognis, Germany. Lipoid S100^o and sodium glycocholate (Nagch) was gifts from Lipoid, Germany and New Zealand Pharm. Lim., respectively. Tween^o 20 was obtained from Merck, Germany. Budesonide (BDS) was purchased from Crystal Pharma, Spain and Eudragit^o S 100 was supplied from Evonik, Germany. All other reagents were of analytical grade purity.

PREPARATION OF BDS-SLNS

SLNs were prepared by melt emulsification method using high-shear rotor-stator homogenization (7 min, 24000 rpm; Ultra-turrax^o T18, Ika-Werke, Germany). Formulation optimization was performed using response surface methodology (*i.e.* central composite design: blocked cube star) by evaluating the influence of the concentration of GMS, Lipoid^o S100 and Nagch on the mean particle size and polydispersity index (PDI) of the prepared samples. In order to stabilize SLNs against aggregation in GIT, as well as to obtain local colon drug delivery, optimized formulation (*sample 1*) was further modified by incorporation of 5% Tween 20 (*sample 2*) and coated with Eudragit^o S 100 in SLN/polymer ratio 1:10 (*sample 3*) by spray-drying (Buchi 290, Mini Spray Dryer, Swiss).

CHARACTERIZATION OF BDS-SLNS

The particle size of BDS-SLNs was measured by Zetasizer Nano Series, Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., UK. The zeta potential measurements were done after suspending the particles in buffer solutions (pH 2.0 and 7.4) of low molarities and ionic strength. *In vitro* GI stability was investigated by incubation of SLNs for 2 h in different artificial GI fluids and mean particle size and surface charge were measured. Encapsulation efficiency (EE%) of BDS in SLNs was determined by validated HPLC method.

The drug release studies from SLNs were performed in buffer solutions at pH 2.0 and 7.4 using the dialysis membrane. At specific time intervals aliquot of the dissolution medium were withdrawn and BDS in the sample solutions was analyzed by the HPLC. The *in vitro* release patterns were evaluated for linear curve fitting to zero order equation, first order equation, Higuchi's square root of time equation and Weibull model.

RESULTS AND DISCUSSION

By using 10% GMS, 1.4% Lipoid^oS 100 and 0.4% NAGch (Fig.1, grey painted region), particles with an average diameter of 136 nm (PDI 0.27) and unimodal narrow size distribution were prepared.

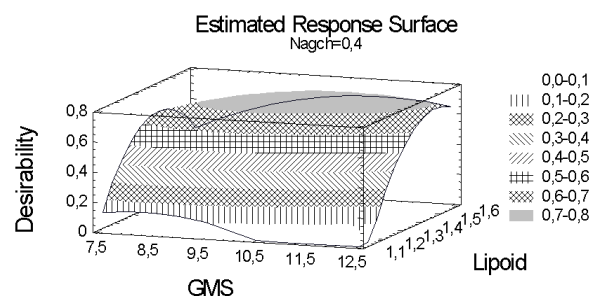


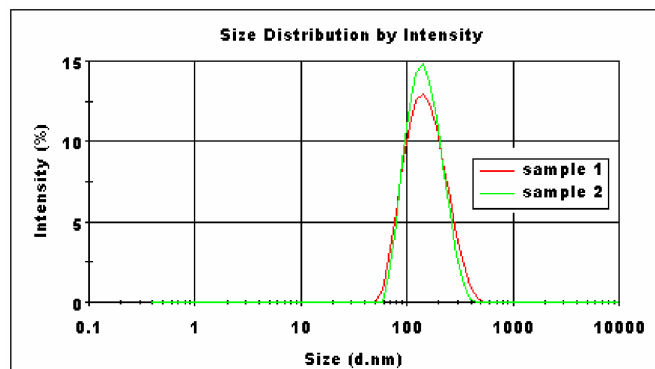
Fig. 1. Response-surface graph showing optimal concentrations of formulation components by minimizing SLNs diameter and PI

There was no significant difference in particle size between unmodified and Tween 20 modified formulations (Fig. 2). However, addition of non-ionic surfactant efficiently stabilized SLNs against aggregation/

particle growth in acidic pH.

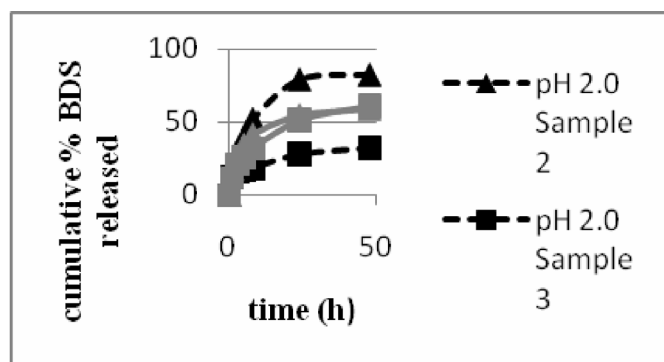
Zeta potential of Tween 20 stabilized particles measured in buffers at pH 2.0 and 7.4 was 0.5 and -18.8 mV, respectively, while drug EE was $92.4\% \pm 1.85$.

Fig. 2. PDI of different SLNs loaded with BDS



The release profiles of BDS from designed formulations in buffer solutions at pH 2.0 and 7.4 are presented in Fig. 3.

Fig. 3. Release profiles of BDS from different SLNs in buffers with pH



2.0 and 7.4

Eudragit coating has successfully sustained the release of BDS in buffer solution at pH 2.0, while providing potential for efficient release of BDS at pH 7.4. The release rate was found to follow Higuchi diffusion model ($r > 0.9988$).

CONCLUSION

Presented results confirm the potential of polymer coated SLNs as novel drug carriers for local colon delivery of BDS via peroral administration.

REFERENCES

1. Simonoska Crcarevska M, Glavas Dodov M, Goracinova K, Chitosan coated Ca-alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2008; 68(3):565-578.
2. Serpe L, Canaparo R, et al. Solid lipid nanoparticles as anti-inflammatory drug delivery system in a human inflammatory bowel disease whole-blood model. Eur. J. Pharm. Sci. 2010; 39:428-436.

ФОРМУЛАЦИЈА НА СЛН СО ЕНКАПСУЛИРАН БУДЕЗОНИД ЗА НАСОЧЕНО И КОНТРОЛИРАНО ДЕЛУВАЊЕ ВО КОЛОНОТ

Х. Литовин, К. Горачинова, Н. Гешковски, М. С. Црцаревска, С. Димчевска, К. Младеновска, М. Главаш Додов

Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, 1000 Скопје, Македонија

ВОВЕД

Инфламаторните цревни заболувања- ИБД (улцеративен колит и Кронова болест) се карактеризираат со хронична и неконтролирана инфламација на интестиналната мукоза. Најчесто употребуван лек за локален третман на ИБД е будезонидот (БДС), високо потенциен кортикостероид со мала системска биорасположивост и намален ризик од појава на несакани ефекти. Формулирањето на нанопартикулирани системи како носачи на БДС за *п.о.* апликација претставува значаен прогрес во третманот на ИБД, поради можноста од постигнување на поголема ефикасност и намалување на несаканите ефекти преку ефикасно насочување на лекот до целното место на делување (1).

Цврстите липидни наночестички (СЛН) се воведени како алтернативен систем на традиционалните колоидни носачи. СЛН се изградени од цврст липиден матрикс, кој е биокompatибелен и биоразградлив, со можност за насочено и контролирано ослободување, при што се избегнува фреквентното дозирање, а се зголемува ефикасноста (2).

Цел на трудот беше дизајнирање на СЛН со вграден БДС со дефинирани физичко-хемиски и биофармацевтски карактеристики кои ќе овозможат ефикасен локален третман на ИБД по нивна *п.о.* апликација.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

МАТЕРИЈАЛИ

Како материјали беа користени: глицерил моностеарат (GMS Cutina^o, Cognis, Germany), фосфолипид (Lipoid S100^o, Lipoid, Germany), натриум гликохолат (Nagch, New Zealand Pharm. Ltd), Tween^o20 (Merck, Germany), будезонид (BDS, Crystal Pharma, Spain) и Eudragit^oS100 (Evonik, Germany).

ПОДГОТОВКА НА СЛН ВО ВГРАДЕН БДС

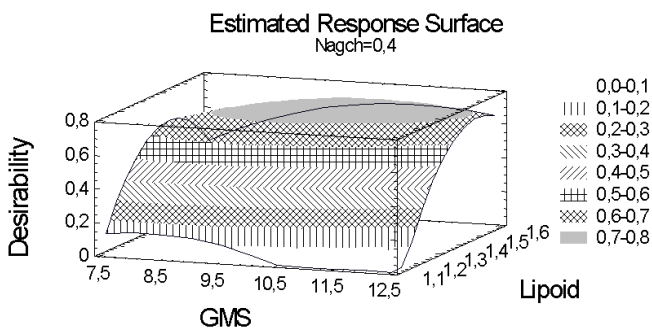
СЛН беа приготвени со техниката на ротор-статор топла хомогенизација (Ultra-turax^o T18, Ika-Werke, Germany; време на хомогенизација 7 мин, 24.000 rpm). Со примена на експериментален централен композитен дизајн беше согледано влијанието на формулациските варијабли: концентрација на ГМС, фосфолипид и Nagch врз средната големина на СЛН и индексот на полидисперзност (PDI). Оптималната формулација беше селектирана со примена на response surface методологијата. Со цел да се обезбеди стабилност на системот *ин vivo* и да се супримира ослободувањето на БДС во горните делови на ГИТ, беше направена површинска модификација на оптималната формулација (примерок 1) преку стерна стабилизација со Tween^o20 (примерок 2) и обложување со Eudragit^o S100 (масен однос полимер/СЛН=10:1) (примерок 3), со техниката на спреј-сушење (Buchi 290, Mini Spray Dryer, Swiss).

КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НА СЛН-БДС

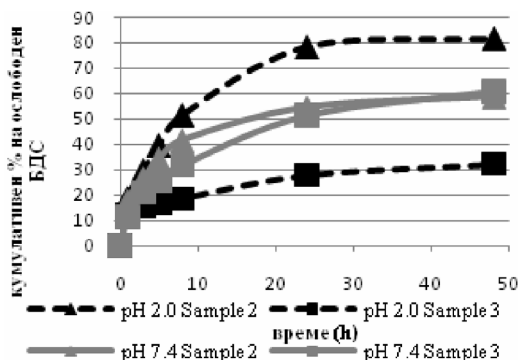
Големината на СЛН и површинската наелектризираност беа определени со примена на Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments Ltd., UK). *Ин витро* ГИ стабилност беше испитана преку следење на промената на големината на СЛН по нивна инкубација во симулирани ГИ пуфери во тек на 2 часа. Ефикасноста на енкапсулација (ЕЕ%) на БДС во СЛН беше определена со примена на валидиран HPLC метод. Брзината на ослободување на БДС од подготвените формулации беше следена во дисолуциони медиуми со рН 2.0 и 7.4. Константите на брзина на ослободување беа пресметани со користење на математичките модели на кинетиките од нулти и прв ред, Higuchi-ева дифузија и Weibull-ов модел.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Оптималната формулација составена од 10% ГМС, 1.4% фосфолипид и 0.4% Nagch резултираше со формирање на СЛН со средна големина од 136 nm и тесна унимодална дистрибуција (PDI 0.27) (Сл. 1. сиво обоен дел). Не беше забележана значителна разлика во големината на стерно обложениите и нативните СЛН.



Слика 1. Response-surface дијаграм: Приказ на оптималната концентрација на составните компоненти на формулацијата преку минимизирање на средниот дијаметар и PDI. Обложувањето со 5% Tween[®]20 обезбеди ефикасна стабилизација на дисперзијата на СЛН во кисела рН средина. Зета потенцијалот на стерно обложениите СЛН во пуфери со рН 2.0 и 7.4 изнесуваше 0.5 и -18.8 mV, соодветно, а ЕЕ изнесуваше 92.4%. Брзината на ослободување на БДС од формулациите во пуфери со рН 2.0 и 7.4 е прикажана на слика 3.



Слика 3. Брзина на ослободување на БДС од подготвените СЛН во пуфери со рН 2.0 и 7.4

Обложувањето на СЛН со еудражит резултираше со успешно супримирање на ослободувањето на БДС во пуфер со рН 2.0, додека во пуфер со рН 7.4 беше постигнато продолжено ослободување. Механизмот на ослободување најдобро може да се опише со Higuchi-евиот модел на дифузија ($r > 0.9988$).

ЗАКЛУЧОК

Презентираните резултати го потврдија потенцијалот на дизајнираните СЛН како носачи на БДС за локален третман во колонот по нивна перорална администрација.

ЛИТЕРАТУРА

1. Simonoska Crcarevska M, Glavas Dodov M, Goracinova K, Chitosan coated Ca-alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2008; 68(3):565-578.
2. Serpe L, Canaparo R, et al. Solid lipid nanoparticles as anti-inflammatory drug delivery system in a human inflammatory bowel disease whole-blood model. Eur. J. Pharm. Sci. 2010; 39:428-436.

CHARACTERIZATION OF SILICA XEROGEL MICROPARTICLES AS 5-FU CARRIERS FOR COLON CANCER THERAPY

B.Djurdjic^{1,2}, N. Geskovski¹, G. Petruševski³, M. Simonoska Crcarevska¹, M. Glavas Dodov¹, M. Cvetkovska⁴, K.Goracinova¹

¹Institute of Pharmaceutical technology, Faculty of Pharmacy, University Ss Cyril and Methodius, Skopje, Macedonia
²Faculty of Pharmacy, University of Montenegro, Podgorica, Montenegro
³Research & Development, Alkaloid AD, Skopje, Macedonia
⁴Faculty of Technology and Metallurgy, University Ss Cyril and Methodius, Skopje, Macedonia

INTRODUCTION

In resent years, selective drug delivery to the colon has been the focus of increasing scientific interest. Colon-targeted drug delivery systems are designed to effectively protect drugs against premature degradation, to localize drug molecules at the targeted site of action and to control the time and rate of drug release. Characteristics of sol-gel processed silica particles such as hydrophilicity, non-toxicity, biocompatibility, biodegradability, stability as well as possibilities of easy chemical and biochemical modification [1] make them favorable systems-carriers for number of biologically active substances, especially in part of formulation of peroral dosage forms with controlled release in GIT. 5-FU is an antineoplastic agent and is the drug of choice for treatment of colon cancer. Microparticulated carrier systems for targeting od 5-FU to the colon would not only reduce the systemic toxicity of the drug but also allow an increase of the drug concentration at the site of action [2]. The purpose of the present study was to evaluate the suitability of silica xerogel microparticles as carrier for site specific and controlled release of 5-FU.

MATERIALS AND METHODS

Materials: Silica xerogel microparticles (MPs) were prepared using the following reagents: tetraethoxysilane (TEOS; Sigma, Germany), 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES; Sigma, Germany), ethanol (Merck, Germany), acetic acid (Merck, Germany), 5-FU (EBEWE Pharma, Austria) and deionised water.

Preparation procedure: Silica xerogel MPs were prepared from TEOS based silica sol (sample 1) and TEOS co-hydrolyzed with 1mol% (sample 2) and 2.5mol% APTES (sample 3) at room temperature by using a one-step acid-catalyzed hydrolysis followed by spray drying of hydrolyzed silica sol (Buchi 290, Mini Spray Dryer, Swiss). 5-FU was added to the sol before spray drying at a concentration of 6 % (w/w). Blank MPs were also prepared.

Characterization procedure: The morphology and surface appearance of the prepared MPs were examined by scanning electron microscopy (Jeol-SEM 6400, Japan). The particle size distribution of MPs was measured by laser diffractometry using Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK). In order to determine 5-FU content in the MPs, predetermined amount of microparticles were dispersed in 1M NaOH under continuous stirring at temperature not exceeding 60°C until clear solution was obtained. 5-FU content in all prepared formulation was determined by HPLC method (HPLC Agilent 1200 with UV detector). Zeta potential of MPs in different buffers of low molarity and ionic strength was measured using Zetasizer Nano Series, Malvern Instruments Ltd.,UK). The mucoadhesion was determined with modified everted sac method [3]. The FT-IR spectra of the prepared microparticles were collected using Varian 660 FT-IR spectrometer (KBr pallets method).

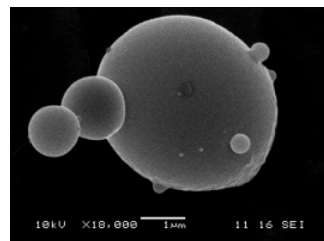
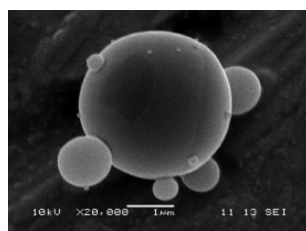
In vitro release studies: The horizontal shaker method was used to study in vitro release profile of 5-FU from prepared formulations. MPs were suspended in 10 ml of phosphate buffer 7.4, to simulate ileo-colon conditions at appropriate intervals, samples (2ml) were withdrawn, filtered through 0.45 µm membrane filter and assayed by HPLC method.

RESULTS AND DISCUSSION

SEM showed that the prepared MPs were spherical with smooth surfaces as show in Fig.1. Particle size distribution of prepared samples appeared as unimodal with median volume diameter 1.41µm (SPAN factor 1.15) and 1.94 µm (SPAN factor 1.10) and 1.95 µm (SPAN factor 1.03) for sample 1, 2 and 3, respectively.

Fig.1.SEM image of unloaded xerogel MPs

Incorporation of APTES during the hydrolysis combined with TEOS



changed the inner structure of the matrix, resulting with increased porosity and hydrophilicity of the network, increasing the average particle size and the loading efficiency of 5-FU. Also, addition of APTES influenced the type of the active groups at the particle surface, resulting with the presence of -amino groups beside -OH groups, simultaneously affecting the surface charge and mucoadhesive potential of prepared organically modified particles (Table 1).

sample	Production yield (%)	5-FU content into MPs (mg/g MP)	Zeta potential, ζ (mV) pH 2.0	Zeta potential, ζ (mV) pH 7.4	Mucoadhesion (%)
1	70.79	46.35	-1.08	-70.13	5
2	48.30	78.13	31.73	-21.50	9.33
3	34.47	93.30	50.00	-15.37	37.89

Table1. Characteristics of prepared formulation

Resulting differences in the FT-IR spectra of 5-FU, unloaded and loaded particles pointed to the existence of hydrogen bonds between 5-FU and the matrix constituents (Fig.2).

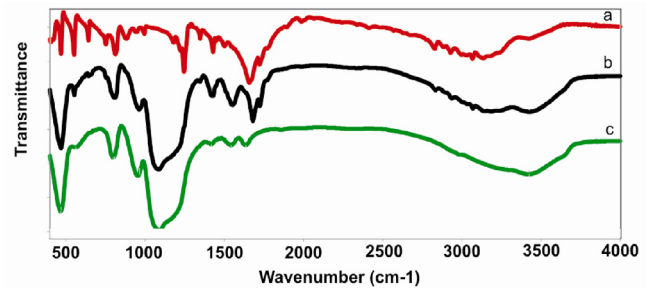


Fig.2. FT-IR spectra of 5-FU (a), loaded organomodified MPs (b), blank organomodified MPs (c);

The dissolution profiles of prepared MPs are presented in Fig. 3 and 4. Differences in the matrix structure and composition due to organic modification during the process of hydrolysis contributed to the faster drug release rate from organically modified xerogel systems and burst release varied accordingly to the % of APTES.

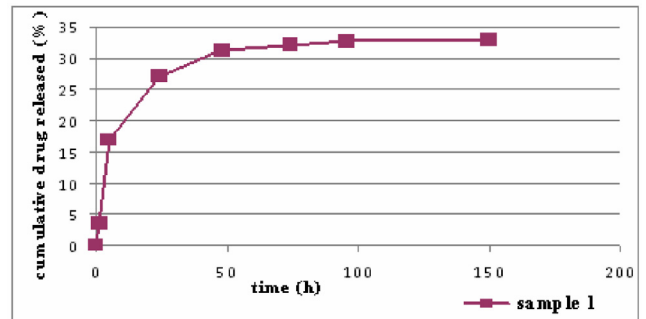
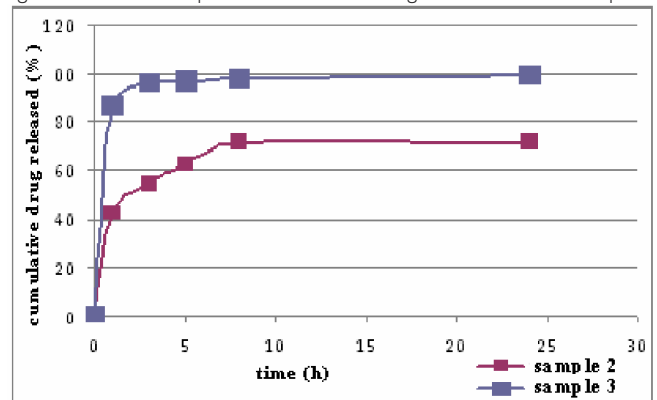


Fig.3. In vitro release profile of 5-FU from TEOS based MPs in phosphate buffer pH 7.4

Fig.4. In vitro release profile of 5-FU from organomodified MPs in phosphate buffer pH 7.4



phate buffer pH 7.4

CONCLUSION

Presented work reveals the potential of TEOS and organomodified microparticles as systems for controlled site specific delivery of hydro-soluble anticancer drugs, as 5-FU. Due to specific characteristics of these carriers in vivo they might be used for site specific controlled local colon delivery.

REFERENCES

1. Z.Wu et al., Effects of surface coating on the controlled release of vitamin B1 from mesoporous silica tablets, *Journal of Controlled Release* 119(2007)215-221
2. A.Lamprecht et al., Microspheres design for the colonic delivery of 5-FU, *J.Contr.,Rel.*, 90(2003)331
3. C.A.Santos et al., Correlation of two bioadhesion assays: the everted sac technique and the CAHN microbalance. *J.Controlled Release* 61(1999) 113-122

DISSOLUTION STUDIES OF ALPHA LIPOIC ACID CAPSULES

D. Dimova, R. Dameska, L. Makraduli, E. Adamova, E. Ristevska, M.Anevskaa, A. Sekovanič, D. Lepčevska, L. Ivčeska, H. Litovin

Replek Farm, Kozle 188, 1000 Skopje, R. Macedonia

INTRODUCTION

Alpha Lipoic Acid (α -Lipoic Acid; Acidum Thiocticum; Alpha Lipoic Acid; Kyselina thioktová; Lipoic Acid; Thioctamidum; Tióctico, ácido; Tioktamid; Tioktamidie) is used in the treatment of diabetic neuropathy for its antioxidant effects. There were attempts for application of Alpha Lipoic Acid in the treatment of liver dysfunction and in subacute necrotising encephalopathy.[1]

Most of the metabolic reactions in which Alpha Lipoic Acid participates occur in mitochondria. The oxidation of piruvic acid (as pyruvate) by the pyruvate dehydrogenase enzyme complex and the oxidation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase enzyme complex are two of the metabolic reactions. [2]

Ph Eur 6.0; BP 2011: Thioctic Acid is yellow, crystalline powder, very slightly soluble in water, very soluble in dimethylformamide, freely soluble in methanol. Melting point about 61 °C. Protect the solutions from light.

USP 32: Alpha Lipoic Acid: Melting point 60 to 62°C.

OBJECTIVES

To investigate the influence of active substance Alpha Lipoic Acid with different granulometric characteristics - granulate and powder, on the dissolution rate and the stability of a pharmaceutical dosage form - capsule.

MATERIALS AND METHODS

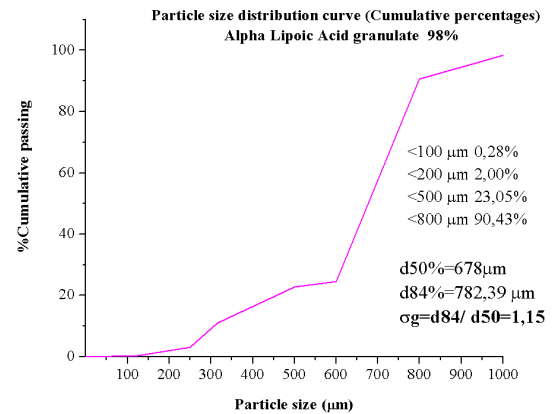
Alpha Lipoic Acid (Hengdian Group Homeland Ltd.); Dissolution test: According to USP/NF, Apparatus 1; Medium: water, 900 ml; Time: 60 minutes; Rotations: 100 rpm. Standard Sieve Analyzator, Erweka Type: VT; Motor type: AR 402; Sieve size: 0,125; 0,25; 0,315; 0,5; 0,6; 0,8; 1 and 1.25 mm; Manufacturer: ERWEKA, Germany

RESULTS

The same formulation of Alpha Lipoic Acid capsules was manufactured with the active substance in a form of powder and granulate. All the excipients were carefully selected to achieve the fill weight in a specific size of capsule.

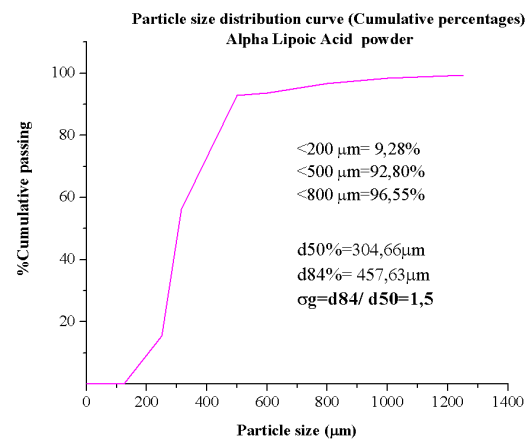
Granulometric (sieve) analysis of the active substance is performed at the Research and Development Laboratory, Replek Farm. The analysis results from are presented below:

Graph 1 Particle size distribution graph for an active substance in a



form of a granulate

Graph 2 Particle size distribution graph for an active substance in a form of a powder



The dissolution test of both capsule formulation according to specified pharmacopoeial method is performed. UV spectrophotometric analysis is performed at waveleghht 220 nm.

Parameters and methods / Limits	capsules with API granulate	capsules with API powder
Identity: (USP/NF) UV-Spect.; HPLC	Conforms	Conforms
Disintegration (Ph.Eur) max 30 min., water, 37±2°C	2 min.	2 min.
Dissolution (USP/NF, App. 1-basket, HPLC min.70% Alpha Lipoic Acid/ capsule	71.74%	100.00%
Assay: (USP/NF) UV-Spect.; HPLC 90-115% of declared content	99.15%	100.55%

Table 1 Results from dissolution testing of capsules filled with Alpha Lipoic Acid granulate and powder

DISCUSSION AND CONCLUSION

According to the above cited analysis results it can be concluded that the dissolution rate is highly influenced by the different granulometric characteristics of the active substance Alpha Lipoic Acid. Capsules filled with Alpha Lipoic Acid in powder form have excellent dissolution rate, unlike the capsules filled with granulate, which have low dissolution rate, according to the specified pharmacopoeial limits. From the stability studies testing results it can be concluded that both formulations are stable and maintain the same analysis results like the results from the beginning of the stability study.

Storage conditions	Capsules with Alpha Lipoic Acid-granulate		Capsules with Alpha Lipoic Acid-powder	
	I dissolution	II content	I dissolution	II content
25°S/ 60%RV	I (%)	II (%)	I (%)	II (%)
0 months	71.74	99.15	100.00	100.55
3 months	70.15	99.87	95.17	98.56
6 months	68.65	98.29	97.25	97.81
9 months	66.82	99.35	98.54	100.73
30°S/65%RV	I (%)	II (%)	I (%)	II (%)
0 months	71.74	99.15	71.74	100.55
3 months	71.18	99.20	71.18	98.56
6 months	70.85	98.38	70.85	100.12
9 months	71.35	98.51	71.35	96.75

Table 2 Results from stability studies of capsules filled with Alpha Lipoic Acid granulate and powder

REFERENCES

1. MartinDale 35 CD-ROM:The Complete Drug Reference 2007
2. PDR Electronic Library
3. Zagorka Koricanac, Mira Ćakar; Spectrophotometric determination of thioctic acid in water and pharmaceutical preparations, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, 2006

ИСПИТУВАЊЕ НА РАСТВОРЛИВОСТ НА АЛФА ЛИПОИК АЦИД КАПСУЛИ

Д. Димова, Р. Дамеска, Л. Макрадули, Е. Адамова,
Е. Ристевска, М.Аневска, А. Секованиќ,
Д. Лепчевска, Л. Ивческа, Х. Литовин

Реплек Фарм, Козле 188, 1000 Скопје, Р. Македонија

ВОВЕД

Alpha Lipoic Acid (α -Liponic Acid; Acidum Thiocticum; Alpha Lipoic Acid; Kyselina thioctová; Lipoic Acid; Thiocetamidum; Tióctico, ácido; Tioktamid; Tioktamidie) заради силните антиоксидантни ефекти се користи во третманот на дијабетична невропатија. Постојат обиди за примена на оваа активна супстанција и во третманите на хепарна дисфункција и субакутна некротизирачка енцефалопатија [1]. Најголемиот број на метаболички реакции во кои учествува киселината се случуваат во митохондриите. Тука е вклучена оксидацијата на пирувинската киселина под дејство на ензимскиот комплекс пируват дехидрогеназа и оксидацијата на алфа-кетоглутарат под дејство на ензимскиот комплекс алфа-кетоглутарат дехидрогеназа[2].

Ph Eur 6.0; BP 2011: Thioctic Acid е жолт, кристален прашок, многу тешко растворлив во вода, лесно растворлив во диметил формамид, лесно растворлив во метанол. Температура на топење околу 61°C. Растворите треба да се заштитат од светлина.

USP 32: Alpha Lipoic Acid: Температура на топење помеѓу 60-62°C.

ЦЕЛ

Испитување на влијанието на гранулометриските карактеристики на Alpha Lipoic Acid - гранулат и прашок врз растворливоста на фармацевтската дозирана форма - капсула, како и на стабилноста на препаратот.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Alpha Lipoic Acid (Hengdian Group Homeland Ltd.); Тест за растворливост: според USP/NF, Апарат 1-корпа во прочистена вода, 900 ml; за 60 минути и број на ротации од 100 rpm. Standard Sieve Analyzer, Erweka Tip:VT; Motor type:AR 402; Дијаметар на отворите на ситата: 0,125; 0,25; 0,315; 0,5; 0,6; 0,8; 1 и 1.25 mm; Производител: ERWEKA, Германија

РЕЗУЛТАТИ

Изработена е по една иста формулација на капсули со Alpha Lipoic Acid во облик на гранулат и во облик на прашок. Експииенсите се соодветно одбрани за да се постигне потребната маса на полнење на капсули. Гранулометриска (сито) анализа на активната супстанција е извршена во развојната лабораторија. Добиени се следниве експериментални резултати за дистрибуцијата на честички:

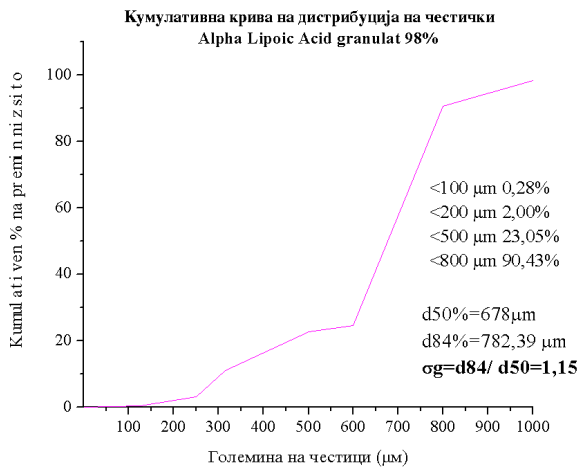


График 2 Дистрибуција на честички по големина - гранулат

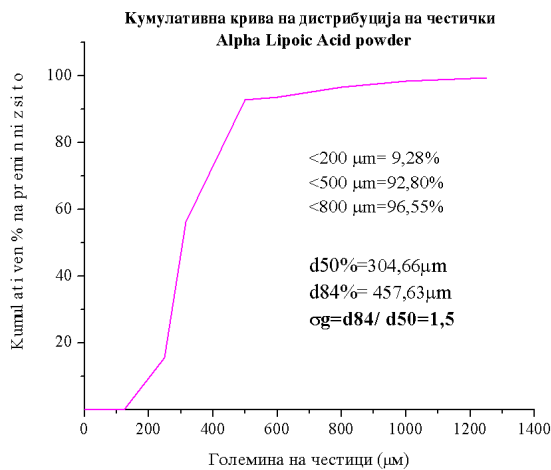


График 1 Дистрибуција на честички по големина- прашок

Тестирана е растворливоста на двете проби на капсули соодветно на пропишаниот фармакопејски метод. Се врши UV спектрофотометриска анализа на 220 nm.

Параметри и методи / Барања	капсули-со гранулат	капсули-со прашок
Идентитет: (USP/NF) UV-Спект.; HPLC	Одговара	Одговара
Распадливост (Ph.Eur) max 30 мин., вода, 37±2°C	2 мин.	2 мин.
Растворливост (USP/NF, App. 1-корпа) HPLC min.70% Alpha Lipoic Acid / капсула	71.74%	100.00%
Содржина: (USP/NF) UV-Спект.; HPLC 90-115% од декл. содржина	99.15%	100.55%

Табела 1 Резултати од растворливост на капсули изработени со Alpha Lipoic Acid - гранулат и прашок

Заклучок: Од добиените резултати за растворливост може да се заклучи дека има силно влијание на различните гранулометриски карактеристики на активната супстанција Alpha Lipoic Acid врз растворливоста. Капсулите наполнети со активна супстанција во облик на прашок имаат одлична растворливост, за разлика од оние наполнети со гранулат кои имаат минимум растворливост споредено со фармакопејски пропишаниот лимит на толеранција. Резултатите од студијата на стабилност покажуваат дека и двете проби се стабилни и ги задржуваат почетните резултати од анализа.

Услови на чување	Капсули со Alpha Lipoic Acid-гранулат		Капсули со Alpha Lipoic Acid-прашок	
	I р-рливост II содржина	I р-рливост II содржина	I р-рливост II содржина	I р-рливост II содржина
25°C/ 60%RV	I (%)	II (%)	I (%)	II (%)
0 месеци	71.74	99.15	100.00	100.55
3 месеци	70.15	99.87	95.17	98.56
6 месеци	68.65	98.29	97.25	97.81
9 месеци	66.82	99.35	98.54	100.73
30°C/65%RV	I (%)	II (%)	I (%)	II (%)
0 месеци	71.74	99.15	71.74	100.55
3 месеци	71.18	99.20	71.18	98.56
6 месеци	70.85	98.38	70.85	100.12
9 месеци	71.35	98.51	71.35	96.75

Табела 2 Резултати од студија на стабилност на капсули изработени со Alpha Lipoic Acid - гранулат и прашок

ЛИТЕРАТУРА

- MartinDale 35 CD-ROM:The Complete Drug Reference 2007
- PDR Electronic Library
- Zagorka Koricanac, Mira Ćakar; Spectrophotometric determination of thioctic acid in water and pharmaceutical preparations, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, 2006

FORMULATION AND CHARACTERIZATION OF AMINO-FUNCTIONALIZED SILICA PARTICLES FOR BUDESONIDE DELIVERY

V. Petrovska¹, K. Goracinova¹, M. Simonoska Crcarevska¹, A. Georgieva³, N. Geskovski¹, M. Cvetkovska², M. Glavas Dodov¹

¹Faculty of Pharmacy, University of Ss Cyril and Methodius, Skopje, Macedonia

²Faculty of Technology and Metallurgy, University of Ss Cyril and Methodius, Skopje, Macedonia

³Alkaloid AD, Skopje, Macedonia

INTRODUCTION

During the past decades a diversity of polymer based pharmaceutical carriers have been developed as new means for controlled and site-specific drug delivery. Sol-gel procedure is very attractive to prepare silica particles for biomedical applications. When silica-based materials are used as drug carriers, several factors such as pore size distribution, morphology and surface functionality can affect the performance of the designed systems. Therefore, changes in the reaction conditions during sol-gel processing as well as partial substitution of tetraethoxysilane (TEOS) as a silica source with precursor with alkyl substituted alkoxyde could modify the structure, surface properties and chemical reactivity of the designed carrier thus affecting the dissolution and degradation rate as well (1,2). The aim of this work was to design and evaluate inorganic and organic/inorganic hybrid xerogel particles prepared with various initial TEOS/water ratios as suitable carriers of budesonide (BDS) with controlled release properties.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

Inorganic xerogel NPs and organic/inorganic hybrid particles were prepared using TEOS (Sigma, Germany), 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES; Sigma, Germany), ethanol (Merck, Germany), acetic acid (Merck, Germany), BDS (Crystal Pharma, Spain) and deionised water. All other chemicals were of analytical grade and were used as received.

PREPARATION OF THE PARTICLES

Silica xerogel NPs containing 2% w/w of BDS were prepared via a one step acid catalyzed sol-gel process. The molar ratios of TEOS:water:ethanol:acetic acid were 0.02:5.5:1.71:0.02 and 0.02:11.1:3.42:0.02, respectively (samples 1T and 2T). Hydrolyzed silica sol was spray-dried (Buchi 290, Mini Spray Dryer, Swiss) under following process conditions: inlet temperature 135 °C, flow rate 4 ml/min, volume flow 35m³/h and spray flow 600 NL/h. The organic/inorganic hybrid particles (samples 1AP and 2AP) were prepared by co-condensation method by partial substitution of TEOS with 2.5 mol% of APTES and were spray dried as described above. Blank particles were also prepared as comparison.

CHARACTERIZATION OF THE PARTICLES

SEM of the particles was carried out using a JEOL 6400, Japan. Particle size analysis was performed using laser diffractometry (HydroG/S/M 2000; Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd., UK). Zeta potential determinations (Zetasizer Nanoseries, Nano-ZS, Malvern Ins., UK) were

based on electrophoretic mobility of the particles in buffer solutions (pH 2.0 and 7.4) of low molarities and ionic strength. Infrared spectra of blank and BDS loaded particles were recorded with FT-IR spectrometer (Varian 2000 FT-IR, USA) using KBr method. The encapsulation efficiency (EE%) of BDS in designed formulations was determined by HPLC method (Agilent 1200 with UV detector, column RP C-18 Lichrocart, Merck, Germany). The dissolution profiles of BDS from TEOS based and hybrid particles were studied in buffer solution at pH 7.4 in closed glass tubes at 37 °C and 50 horizontal strikes/min. At predetermined time intervals, samples were withdrawn, membrane filtered and the content of BDS in the release medium was quantified by HPLC.

RESULTS AND DISCUSSION

By varying TEOS/water molar ratio particles with different properties were obtained. NPs synthesized from TEOS were spherical with smooth surfaces (Fig. 1), with mean size between 0.7 and 0.8 µm and unimodal narrow size distribution. Amino-modified hybrid silica particles were also spherical, but had a larger mean size and wider particle size distribution (Table 1).

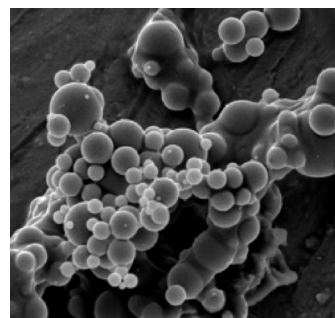


Fig.1. SEM micrograph of blank xerogel NPs

Organic groups linked to the oxide network by stable chemical bonds not only changed the inner structure of the matrix by disrupting the regularity of the silica network, thus changing the porosity and increasing the average size, but also affected the EE (%) and particles surface charge (Table 1).

S.	dv ₅₀ (µm) ±SD	SPAN factor ±SD	EE %	Zeta potential (mV) ±SD	
				pH 2	pH 7.4
1T	0.98±0.2	1.2±2.5	81.7	+10.5±1.6	-35.4±0.6
2T	0.74±0.1	1.1±0.1	87.0	+9.6±0.5	-31.3±0.7
1AP	1.99±0.1	1.6±0.4	92.7	+35.0±4.5	+28.8±1.4
2AP	1.65±0.4	1.4±0.1	98.0	+32.7±1.2	+30.1±0.2

Table 1. Physicochemical characteristics of particles

The incorporation of aminopropyl groups into the silica matrix was qualitatively confirmed by FT-IR spectra. Data suggested that BDS was effectively entrapped into particles at a molecular level. The dissolution profiles of TEOS based and hybrid particles in phosphate buffer pH 7.4 are presented in Fig. 2.

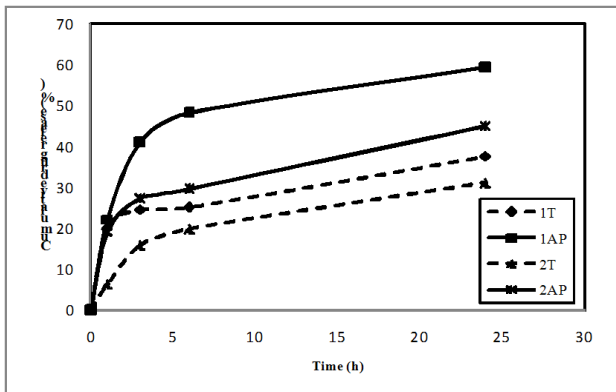


Fig. 2. Release profiles of BDS from prepared formulations

The drug release showed a dual-phasic profile with initial bursts of 20-40% and a slower release period. The differences in release rate between TEOS based and APTES modified particles could be attributed to the presence of functional groups on the pore walls thus increasing the porosity and hydrophilicity of the network. Therefore, BDS molecules diffuse out more rapidly from organic/inorganic hybrid matrix than from TEOS base particles.

As a conclusion, spray drying has been shown to be a fast and simple method for obtaining particles from silica sol for controlled drug delivery. Changes in the reaction conditions during sol-gel processing and partial substitution of TEOS with APTES modified the morphology of silica xerogels, resulting in increased average size, loading efficiency and rate of BDS released. Also, the presence of amino groups affected the surface charge, thus increasing the stability of the prepared carrier system.

REFERENCES

- Zhijian Wu Z, Xiang H, et al. Surface properties of submicrometer silica spheres modified with aminopropyltriethoxysilane and phenyltriethoxysilane. J. Control. Release 2006; 304:119-124.
- Zhang Y, Zhi Z, et al. Spherical mesoporous silica nanoparticles for loading and release of the poorly water-soluble drug telmisartan. J. Control. Release 2010; 145:257-263.

ФОРМУЛАЦИЈА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НА АМИНО-ФУНКЦИОНАЛИЗИРАНИ СИЛИКА ЧЕСТИЧКИ ЗА КОНТРОЛИРАНО ОСЛОБОДУВАЊЕ НА БУДЕЗОНИД

В.Петровска¹, К.Горачинова¹, М. Симоноска Црцаревска¹, А. Георгиева³, Н.Гешковски¹, М.Цветковска², М.Главаш Додов¹

¹Фармацевтски факултет, Универзитет Св.Кирили Методиј, Скопје, Македонија

²Технолошко-металуршки факултет, Универзитет Св.Кирил и Методиј, Скопје, Македонија

³Алкалоид АД, Скопје, Македонија

ВОВЕД

Во токов на изминатите децении развиени се разновидни полимерни носачи за насочено и контролирано ослободување на активната супстанција. Со цел подготовка на силика честички за биомедицинска апликација, сол-гел процесот е процес од избор.

Морфолошките карактеристики и површинската функционализација влијае врз перформансите на овие системи. Токму поради ова, промените на реакционите услови како и парцијалната супституција на тетраетоксисиланот (ТЕОС) кој е силика прекурсор, со алкил супституиран алкоксид ќе резултира со промена во структурата, површинските карактеристики и хемиската реактивност на формулираниот носач. Сето ова пак ќе резултира со промени и во брзината на ослободување на активната супстанција (1,2).

Целта на овој труд беше дизајнирање и евалуирање на неоргански и органско/неоргански хибридни силика ксерогел честички подготвени со различни моларни односи алкоксид/вода како погодни носачи за контролирано ослободување на будезонид.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

МАТЕРИЈАЛИ

Неорганските и органско/неорганските хибридни силика честички беа подготвени со ТЕОС (Sigma, Germany), 3-аминопропилтриетоксисилан (АПТЕС) (Sigma, Germany), етанол (Merck, Germany), оцетна киселина (Merck, Germany), будезонид- БДЗ (Crystal Pharma, Spain) и дестилирана вода. Сите останати супстанции беа со аналитичка чистота.

ПОДГОТОВКА НА ЧЕСТИЧКИ

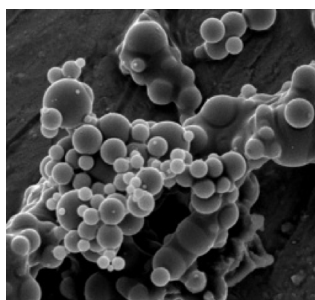
Силика ксерогел честички кои содржат 2% м/м будезонид беа подготвени преку киселинско катализиран сол-гел процес. Моларните односи на ТЕОС:вода:етанол:оцетна киселина беа 0.02:5.5:1.71:0.02 и 0.02:5.5:3.42:0.02 соодветно (проби 1Т и 2Т). По кондензацијата честичките беа спреј сушени (Buchi 290, Mini Spray Dryer, Swiss) под следните услови: влезна температура 135°C, проток на проба 4 ml/min, проток на воздух за сушење 35m³/h и проток на воздух за распрнување 600 NL/h. Со метод на ко-кондензација преку парцијална супституција на ТЕОС со 2.5 мол% на АПТЕС беа подготвени органско/неорганските хибридни честички (проби 1АП и 2АП) користејќи ги горенаведените услови на спреј сушење. Беа подготвени и празни честички за споредба.

КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НА ЧЕСТИЧКИТЕ

Морфолошката карактеризација (СЕМ) беше извршена со примена на JEOL 6400, Јапан. Големината и дистрибуцијата на честички по големина беше извршена со примена на ласерска дифрактометрија. (HydroG/S/M 2000; Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd., UK). Беше одреден зета потенцијалот (Zetasizer Nanoseries, Nano-ZS, Malvern Ins., UK) во пуфери (pH 2.0 and 7.4) со ниска јачина и strikes/min. моларност. ФТИР спектри на празни и честички полни со БДЗ беа снимена со KBr (Varian 2000 FT-IR, USA) Ефикасноста на енкапсулација (ЕЕ) на БДЗ во формулациите беше одредена со HPLC метода (Agilent 1200 со UV детектор, колона RP C-18 Lichrocart, Merck, Germany). Ослободувањето на БДЗ од неорганските и хибридниите честички беше следена во пуфер pH 7.4 на термостатирана водена бања (37°C) со мешач (Unitronic OR Selecta, Spain).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Добиените честички беа сферични со мазна површина (Сл. 1), со среден волуменски дијаметар помеѓу 0.7 and 0.9 nm и со тесна унимодална дистрибуција. Хибридниите силика честички беа сферични но поголеми и со поширока дистрибуција (Таб 1).



Сл 1. СЕМ на празни ксерогел честички

Органските групи поврзани со кислородната мрежа преку стабилни хемиски врски не само што ја менуваат внатрешната структура на матрицот преку разрушување на силикатната мрежа туку ја менуваат порозноста, површинската наелектризираност, ја зголемуваат големината и ефикасноста на енкапсулација (Таб 1).

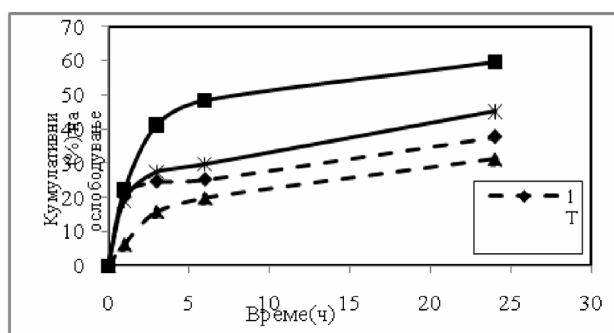
Табела 1. Физичко хемиски карактеристики

Инкорпорирањето на аминокпропил групите е потврдено преку FT-IR

П	d_{v50} (μm) \pm SD	SPAN factor \pm SD	EE %	Зета потенцијал (mV) \pm SD	
				pH 2	pH 7.4
1Г	0.98 \pm 0.2	1.2 \pm 2.5	81.7	+10.5 \pm 1.6	-35.4 \pm 0.6
2Г	0.74 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	87.0	+9.6 \pm 0.5	-31.3 \pm 0.7
1АП	1.99 \pm 0.1	1.6 \pm 0.4	92.7	+35.0 \pm 4.5	+28.8 \pm 1.4
2АП	1.65 \pm 0.4	1.4 \pm 0.1	98.0	+32.7 \pm 1.2	+30.1 \pm 0.2

спектрите. Резултати го потврдуваат инкорпорирањето на БДЗ на молекуларно ниво. Ослободувањето на БДЗ од неорганските и неорганско/органските честички во фосфатен пуфер е прикажано на Сл 2.

Иницијално се ослободуваат 20-40%, а потоа следи побавно



ослободување. Разликите во ослободувањето честичките се должи на присуството на функционални групи кои допринесуваат во порозноста и хидрофилноста на мрежата, поради што молекулите на БДЗ дифундираат побрзо низ матрицот. Можеме да заклучиме дека спреј сушењето е брз и едноставен метод за добивање на силика честички со контролирано ослободување. Промена на условите за време на сол-гел процесот како и парцијалната супституција на ТЕОС со АПТЕС ги менува морфолошките карактеристики на системот што доведува до промена во големината, ЕЕ(%) како и степенот на ослободување на активната супстанција. Присуството на аминокпропил групи влијае врз површинската наелектризираност со што се зголемува стабилноста на подготвениот систем.

РЕФЕРЕНЦИ

1. Zhijian Wu Z, Xiang H, et al. Surface properties of submicrometer silica spheres modified with aminopropyltriethoxysilane and phenyltriethoxysilane. *J. Control. Release* 2006; 304:119-124.
2. Zhang Y, Zhi Z, et al. Spherical mesoporous silica nanoparticles for loading and release of the poorly water-soluble drug telmisartan. *J. Control. Release* 2010; 145:257-263.

FORMULATION OF DENTAL GEL WITH MICRO PARTICLES LOADED WITH TEA TREE OIL, *MELALEUCA ALTERNIFOLIA*

M. Stefkova, M. Glavas Dodov, N. Geskovski,
M. Simonoska Crcarevska, K. Goracinova

Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, 1000 Skopje,
Republic of Macedonia

INTRODUCTION

Gingivitis is undestructive periodontal disease mainly caused by bacterial biofilm – plaque, adhered on the teeth surface and it is the most frequent form of periodontal disease (1). The local activity potential and prolonged contact time as well as the control of the release rate of the active substance from the carrier-microparticles are rational approaches for formulation of an effective and stable therapeutical dosage form for treatment of periodontal diseases (2). Dental gels as pharmaceutical dosage forms provide prolonged contact time and possibility for precise dosage of the active substance, locally, at the place of the infection.

Alginate, with its muco/bioadhesive characteristics, biocompatibility and biodegradability and pH depended swelling effects provides an opportunity for prolonged release of active substance and it is an excellent candidate for designing controlled release microparticulate systems. The essential oil of tea tree, *Melaleuca alternifolia*, Myrtaceae, has strong antimicrobial activity, especially on cariogenic bacteria. (3, 4, 5).

Having this into consideration, the aim of this study was to develop a dental gel formulation with calcium-alginate microparticles (MPs) loaded with tea tree oil.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the formulations. Tea tree oil microparticles were prepared using sodium alginate (Protanal LF 10/60, FMC BioPolymer, Norway), calcium chloride (Alkaloid, Macedonia) and tea tree oil (*Melaleuca aetheroleum*, Jan Spider, Croatia). The preparation procedure included emulsification of the tea tree oil and its encapsulation in calcium alginate (Ca-Alg) MPs using method of spraying into crosslinking solution (Buchi Mini Spray dryer B-290, Switzerland) (6). The obtained water dispersion of MPs (*MD Ca-Alg Mps*) was lyophilized (*LF Ca-Alg Mps*) using Labconco, FreeZone 2.5L Freeze Dry System, USA. For dental gel preparation, Noveon AA-1 (Noveon Europe BVBA, Belgium), polymer of acrylic acid, cross-linked with divinyl glycol was used. The lyophilized microparticles (LF Ca-Alg Mps) at concentration of 2% (m/m) were incorporated in the previously prepared gel.

Characterization of the prepared formulations. The mean particle size and the particle size distribution of the microparticles was determined by laser diffractometry (Mastersizer 2000, Malvern Instr., Ltd, UK). Using the same technique, the swelling index of Ca-Alg MPs in simulated saliva (pH 7.4), was determined in intervals of 1, 3, 5 and 24 hours.

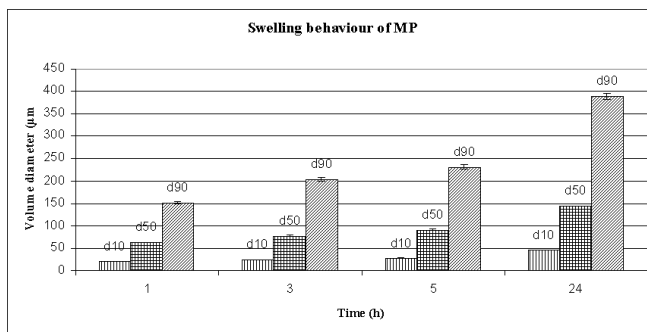
The antimicrobial activity evaluation of the prepared Ca-Alg MPs using method of diffusion on agar was made (7). *Streptococcus mutans*, ATCC 25175 was used as the most frequent cause for gingivitis (1). The stability of the prepared gel formulations with incorporated Ca-Alg MPs was determined in 6 months period, at temperatures of 25 °C ± 2 °C / 65% RH ± 5% RH and 37 °C ± 2 °C / 65% RH ± 5% RH, through determination of the parameters appearance and pH of the gel.

RESULTS AND DISCUSSION

Using the technique of emulsification and spraying without drying, VD Ca-Alg MPs and LF Ca-Alg MPs encapsulated with tea tree oil were prepared. The mean diameters of the prepared formulations is shown in Table 1.

Sample	d10(µm) ± SD	d50(µm) ± SD	d90(µm) ± SD
VD Ca-Alg MPs	29.67 ± 0.18	106.22 ± 0.60	271.93 ± 1.14
LF Ca-Alg MPs	22.88 ± 0.32	74.41 ± 1.66	192.15 ± 4.82

Table 1. Mean volume diameter of the prepared formulations (n=6). The swelling index of Ca-Alg MPs loaded with tea tree oil in simulated saliva with pH 7.4 at different time intervals, in 24 hours period is shown in Picture 1. The microparticles showed significant swelling behaviour, which is in favor of their prolonged contact on the gingiva and a potential for gradual release of the active substance.



Picture 1. Swelling index of the prepared formulations in simulated saliva (pH 7.4)

At the evaluation of the antimicrobial activity of the prepared Ca-Alg MPs using the method of diffusion on agar, the measured zones of inhibition of growth of the selected bacteria corresponded to the literature data on MIC (Minimum Inhibitory Concentration, % v/v) of tea tree oil (0.25 – 2.0 % v/v) (4,5).

The prepared dental gel formulations showed satisfactory results for stability in the period of examination.

CONCLUSION

The prepared dental gel formulation with microparticles loaded with essential oil, prepared with modified method of spraying without drying, show potential for providing local antibacterial effect and efficacy in the therapy of the periodontal diseases.

REFERENCES

1. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AK, The microbiology of primary dental caries in humans, J Dent Educ., 65, 1028-1037 (2001)
2. Bruschi et al., Oral bioadhesive drug delivery systems, Drug Development and Industrial Pharmacy, 31, 293-310 (2005)
3. Finlay et al., Antiinflammatory activity of tea tree oil (2003)
4. Riley, The antimicrobial activity of tea tree oil (2003)
5. Takarada et al., A Comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral bacteria (2004)
6. Chih P. C., Toshiaki D., Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil and its controlled release, Colloids and surfaces (2003)
7. N. Bou-Chacra et al., Antimicrobial activity of four different dental gel formulas on cariogenic bacteria evaluated using the linear regression method (2005)

ФОРМУЛАЦИЈА НА ДЕНТАЛЕН ГЕЛ СО МИКРОЧЕСТИЧКИ СО ЕНКАПСУЛИРАНО ЕТЕРИЧНО МАСЛО ОД ЧАЈНО ДРВО, MELALEUCA ALTERNIFOLIA

М. Стефкова, М. Главаш Додов, Н. Гешковски,
М. Симоноска Црцаревска, К. Горачинова

Фармацевтски факултет, Водњанска 17, 1000 Скопје, Република Македонија

ВОВЕД

Гингивитисот претставува недеструктивна периодонтална болест која е најчесто предизвикана од бактериски биофилм, ткн. плака, адхериран на површината на забното ткиво и е најчеста форма на периодонтално заболување (1). Потенцијалот за локално делување и продолжување на времето на задржување на системот, како и контролирањето на брзината на ослободување на активната супстанција, претставуваат рационален пристап кон формулирање на ефикасна и стабилна терапевтска дозирана форма за третман на периодонталните заболувања (2). Денталните гелови како фармацевтски дозирани форми обезбедуваат пролонгирано контактено време и можност за прецизно дозирање на активната супстанца локално, на местото на инфекцијата. Алгинатот, со своите муко/биоатхезивни карактеристики, биокомпатибилност и биоразградливост и ефекти на рН зависно бабрење нуди можност за продолжено ослободување на активни молекули и е одличен кандидат за дизајнирање на микропартикуларни системи со контролирано ослободување. Етеричното масло од чајно дрво, *Melaleuca alternifolia*, Myrtaceae, има силно антимикробно дејство особено врз кариогените бактерии (3, 4, 5).

Оттука, цел на овој труд беше развој на формулација на дентален гел со инкорпорирани калциум-алгинатни микрочестички (MPs), во кои беше енкапсулирано етерично масло од чајно дрво.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Подготовка на формулациите. За подготовка на MPs беа користени натриум алгинат (Protanal LF 10/60, FMC BioPolymer, Norway), калциум хлорид (Алкалоид, Македонија) и етерично масло од чајно дрво (*Melaleuca aetheroleum*, Jan Spider, Hrvatska). Постапката се состоеше од емугирање на етеричното масло од чајно дрво и негово енкапсулирање во калциум алгинатни (Ca-Alg) MPs, со примена на едностепена постапка на распрснување без сушење (Buchi Mini Spray dryer B-290, Switzerland) (6). Добиената водена дисперзија на MPs (VD Ca-Alg MPs) понатаму беше лиофилизирана (LF Ca-Alg MPs) (Labconco, FreeZone 2.5L Freeze Dry System, USA).

За подготовка на деналниот гел користен беше Новеон АА-1 (Novelon Europe BVBA, Belgium), полимер на акрилна киселина, вкрстено поврзан со дивинил гликол. Лиофилизираните честички (LF Ca-Alg MPs) беа инкорпорирани во претходно подготвениот гел во концентрација од 2% (м/м).

Карактеризација на подготвените формулации. Средната големина и дистрибуцијата на честичките по големина беше определена со примена на ласерска дифрактометрија (Mastersizer 2000, Malvern Instr., Ltd, UK). Со истата техника определен е степенот на бабрење на Ca-Alg MPs во симулирана плунка (со pH 7.4), во интервали од 1, 3, 5 и 24 часа.

За проценка на антимикробната активност на подготвените Ca-Alg MPs користен е метод на дифузија на агар (7). Користена е бактерија *Streptococcus mutans*, ATCC 25175, како најчест предизвикувач на гингивитис (1).

Стабилноста на подготвените гел формулации со инкорпорирани Ca-Alg MPs беше испитувана во тек на 6 месеци, чувани на 25 °C ± 2 °C / 65% RH ± 5% RH и 37 °C ± 2 °C / 65% RH ± 5% RH, преку следење на параметри изглед и pH на гелот.

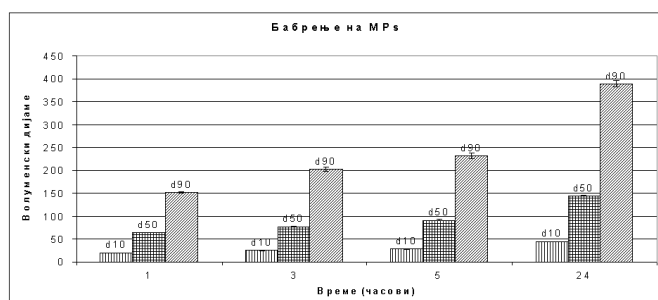
РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Со примена на техника на емулгирање и распрснување без сушење подготвени беа VD Ca-Alg MPs и LF Ca-Alg MPs со енкапсулирано масло од чајно дрво и определена е нивната големина. Средната големина на честичките од подготвените формулации е дадена во Табела 1.

Примерок	d10(µm) ± SD	d50(µm) ± SD	d90(µm) ± SD
VD Ca-Alg MPs	29.67 ± 0.18	106.22 ± 0.60	271.93 ± 1.14
LF Ca-Alg MPs	22.88 ± 0.32	74.41 ± 1.66	192.15 ± 4.82

Табела 1. Среден волуменски дијаметар на подготвените формулации (n=6)

Евалуацијата на резултатите од извршените мерења на степенот на бабрење на Ca-Alg MPs со инкорпорирано етерично масло од чајно дрво во симулирана плунка со pH 7.4 (Слика 1) во различни временски интервали во тек на 24 часа, укажа на нивно изразено бабрење што е во прилог на продолженото задржување на гингивите и потенцијал за постепено ослободување на активната супстанција.



Слика 1. Степен на бабрење на подготвените формулации во симулирана плунка со pH 7.4

При проценката на антимикробната активност на подготвените Ca-Alg MPs со метод на дифузија на агар добиени беа зони на инхибиција на раст на испитуваната бактерија кои соодветствуваат со литературните податоци за MIC (Minimum Inhibitory Concentration, % v/v) на етеричното масло од чајно дрво (0.25 – 2.0 % v/v) (4,5). Подготвените гел формулации покажаа задоволителна стабилност во испитуваниот период.

ЗАКЛУЧОК

Подготвената формулација на денален гел со инкорпорирани микрочестички со етерично масло, добиени со модифицирана метода на распрснување со сушење, покажуваат потенцијал за обезбедување локално антибактериско делување и ефикасност во терапијата на периодонталните заболувања.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AK, The microbiology of primary dental caries in humans, J Dent Educ., 65, 1028-1037 (2001)
2. Bruschi et al., Oral bioadhesive drug delivery systems, Drug Development and Industrial Pharmacy, 31, 293-310 (2005)
3. Finlay et al., Antiinflammatory activity of tea tree oil (2003)
4. Riley, The antimicrobial activity of tea tree oil (2003)
5. Takarada et al., A Comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral bacteria (2004)
6. Chih P. C., Toshiaki D., Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil and its controlled release, Colloids and surfaces (2003)
7. N. Bou-Chacra et al., Antimicrobial activity of four different dental gel formulas on cariogenic bacteria evaluated using the linear regression method (2005)

STRATEGIES FOR IMPROVEMENT OF THE EPR EFFECT OF PLGA AMPHIPHILIC NANOPARTICLES

M. S. Crcarevska¹, N. Geskovski¹, M. G. Dodov¹, S. Calis², S. Dimcevska¹, K. Goracinova¹

¹Faculty of Pharmacy, University of Ss Cyril and Methodius, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

²Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100Ankara, Turkey

INTRODUCTION

Nanoparticle (NP) delivery of anticancer drugs to tumour tissues can be achieved by either passive or active targeting. Passive targeting takes the advantage of the inherent size of NP and exploits the unique anatomical and pathophysiological abnormalities of tumour vasculature, such as the enhanced permeability and retention (EPR) effect. The EPR effect seems to bridge the advances in nanotechnology and the advances in the understanding of tumour vascular biology and, hence, is regarded as a 'gold standard' in the design of new anticancer agents. This approach can effectively enhance drug bioavailability and efficacy [1]. For extravasation of the drug-loaded carrier more selectively at tumour tissues, at least some properties of nanocarriers are particularly important. To successfully take advantage of NP for drug delivery, a number of significant parameters, including size, size distribution, drug loading capacity and incorporation of functionalities, have to be carefully considered and optimized in each application.

We developed modified nanoprecipitation method for hydrophilic drug loading into PLGA amphiphilic nanocarriers [2, 3]. The particles have been made of Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) and tri-block

copolymer Pluronic® F127 (F127). F127 was used in the formulation in order to turn the hydrophobic PLGA surface into a hydrophilic one. As model drug for water soluble substance irinotecan hydrochloride (IR-HCl) was used.

MATERIALS AND METHODS

PLGA (lactate/glycolate ratio 85/15) was purchased from Sigma, Germany, while F127 was generous gift from BASF, Germany. IR-HCl was obtained from Bio-tech Co., China. All other chemicals were of analytical grade.

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NANOPARTICLES

NP were prepared by modified nanoprecipitation method [2, 3]. Three formulations with different proportion of polymers and same drug quantity, produced under identical operating conditions, were prepared. Composition of prepared formulations is given in Table 1. Table 1. Composition of nanoparticles loaded with IR-HCl

	IR-HCl (mg)	PLGA (mg/ml)	F127 (mg/ml)	PLGA:F127
W1-NP	1,5	3,125	2,78	1:0,888
W2-NP	1,5	3,125	5,55	1:1,784
W3-NP	1,5	3,125	8,33	1:2,664

NP were characterized in terms of morphology (Jeol-SEM 6400, Japan), particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential (Zetasizer Nano Series, Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., UK). Encapsulation efficiency (EE) was determined by validated HPLC method, after separation by size-exclusion chromatography (Sephadex G-25 column) and/ or centrifugal ultrafiltration (Vivaspin 20, 1000 KDa, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Germany). Drug release studies were conducted under sink conditions in PBS, during 5 days. F127 quantity incorporated in the nanoparticles was determined. Hence, adsorption studies were conducted and amount of F127 bound to the surface of prepared NP was ascertained using standard depletion method [4].

RESULTS AND DISCUSSION

NP prepared by modified nanoprecipitation, robust and reproducible, production process were with acceptable spherical morphology and smooth surface. Particle size, PDI and encapsulation efficiency are presented in Table 2. The particle size of prepared formulations was in required size range of 20–200 nm, which results in unique interaction with biological systems at the molecular level, thus favoring capitalization on EPR effect for passive accumulation in the target tumor tissues. Having in mind that formulations were prepared under identical operating conditions, it is most likely that initial quantity of F127 used in the formulation has impact on particle size, i.e. higher concentration lead to a reduced NP size. Low values for zeta potential of prepared NP (-1 to -5 mV) are in favor of desired lower opsonization rate thus indicating their ability to be hidden from the RES and hence to prolong blood circulation time.

Table 2. Z-average, PDI and EE of NP (mean ± SD, n = 6)

	Z-average (nm) ± SD	PDI ± SD	EE % ± SD
W1-NP	125 ± 0.1	0.108 ± 0.020	47 ± 2
W2-NP	124 ± 0.2	0.104 ± 0.023	52 ± 3
W3-NP	112 ± 0.1	0.110 ± 0.018	63 ± 3

As it can be seen from Fig.1 the amount of drug released during the period of initial release was probably affected by the composition of

the nanoparticles, thus increasing when the F127 content in the NP was increased. Drug release pattern best fits to Korsmeyer-Peppas model indicating that diffusion is main controlling mechanism for drug release.

Having in mind that opsonization and removal of drug carrier system from the body by RES, is major obstacle for EPR effect, the surface of NP must be sterically stabilized in order to be present in the blood long enough to reach its therapeutic site of action. This could be achieved by incorporation and further adsorption of F127 onto the surface of NP. F127 quantity in prepared NP and consequently adsorbed amount, determined using depletion method, are presented in Table 3. Higher initial F127 quantity used in the production of NP resulted with more hydrophilic NP surface.

Fig 1. In vitro release profile of IR-HCl from prepared NP in PBS pH 7.4 at 37 ± 0.5 °C (mean ± SD, n = 3)

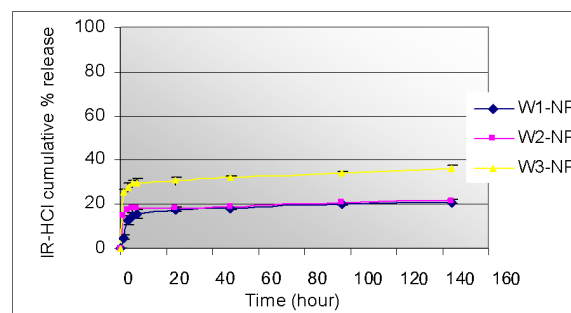


Table 3. Quantity of incorporated and adsorbed F127 in prepared nanoparticles expressed as mg F127/mg PLGA ± SD

	mg Pluronic F127/mg PLGA	
	native NP	Adsorbed NP
W1-NP	0.48 ± 0,1	5,06 ± 0,3
W2-NP	0.69 ± 0,15	5,37 ± 0,3
W3-NP	1.32 ± 0,14	5,66 ± 0,4

CONCLUSION

The current study has shown that prepared PLGA amphiphilic NP (i) exhibit adequate size and surface charge; (ii) efficient drug loading; (iii) controlled release properties and (iv) have sterically stabilized, hydrophilic surface. It could be concluded that prepared NP can be used as promising carriers for solid tumor targeting utilizing EPR effect, but further optimization is necessary to exploit their full potential. Our future work will focus on the suitability and application of these carriers *in vivo* on animal models.

REFERENCES

1. Maeda, H. (2001). The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting, *Adv Enzyme Regul* 41: 189-207.
2. Glavas, M., Calis, S., Simonoska M., Geskovski, N., Goracinova, K. (2011). Colloidal carriers for anticancer drug delivery – formulation aspects, *Proceedings of International Symposium on Drug Research and Development, Antalya, Turkey*
3. Simonoska Crcarevska, M., Geskovski, N., Kuzmanovska, S., Glavas Dodov, M., Calis, S., Goracinova, K. (2011). Preparation and biological evaluation of irinotecan loaded biodegradable nanocarriers for tumour delivery by EPR effect, *Proceedings of 3rd PharmSciFair, Prague, Czech Republic*
4. Shar, J. A., Obey, T. M., Cosgrove, T. (1998). Adsorption studies of polyethers Part 1. Adsorption onto hydrophobic surfaces. *Colloid Surface A* 136 (1-2): 21-33.

СТРАТЕГИЈА ЗА ОБЕЗБЕДУВАЊЕ НА EPR ЕФЕКТ НА PLGA АМФИФИЛНИ НАНОЧЕСТИЧКИ

М. С. Црцаревска¹, Н. Гешковски¹, М. Г. Додов¹,
С. Чалиш², С. Димчевска¹, К. Горачинова¹

¹Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје, Македонија

²Фармацевтски факултет, Универзитет Хаџетепе, 06100 Анкара, Турција

ВОВЕД

Насочувањето на антиканцер лековите кон туморните промени во организмот со помош на нанопартикулирани системи (НП) може да се постигне со т.н. пасивен и активен таргетирање. Во основата на пасивниот таргетирање е искористувањето на анатомските и патофизиолошките абнормалности на туморната васкулатура што овозможува акумулација на лекот на местото на патолошките промени како резултат на подобрена пермеабилност и задршка т.е. т.н. EPR (Enhanced Permeability and Retention) ефект. EPR ефектот претставува 'златен стандард' при дизајнирање на нови антиканцер агенси. Ваквиот пристап може да ја зголеми биорасположливоста и ефикасноста на лекот [1]. При развој и оптимизација на НП, посебно внимание треба да се обрне на одредени нивни физичко-хемикалски карактеристики, како што се големината и дистрибуцијата по големина, капацитетот за енкапсулација, како и можностите за нивна функционализација.

За подготовка на НП беа употребени Poly(D,L-lactide-co-glycolide)acid (PLGA) и три-блок кополимер Pluronic F127 (F127). Улогата на F127 е да обезбеди хидрофилни карактеристики на хидрофобната НП површина. Како модел лек е употребен иринотекан хидрохлорид (IR-HCl), хидросолубилна лековита супстанција.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

PLGA (лактат/гликолат = 85/15) е набавена од Sigma, Германија, додека F127 е дониран од BASF, Германија. IR-HCl е набавен од Biotech Co., Кина. Сите други употребени хемиски супстанции се со аналитички степен на чистота.

ПОДГОТОВКА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НА НП

НП се добиени со примена на модифицирана напреципитациска постапка [2,3]. Под идентични услови беа подготвени три формулации со различна количина на полимери и идентична количина на лек. Составот на подготвените формулации е прикажан во Табела 1.

Табела 1. Состав на НП со инкорпориран IR-HCl

	IR-HCl (mg)	PLGA (mg/ml)	F127 (mg/ml)	PLGA:F127
W1-NP	1,5	3,125	2,78	1:0,888
W2-NP	1,5	3,125	5,55	1:1,784
W3-NP	1,5	3,125	8,33	1:2,664

НП беа карактеризирани во однос на нивната морфологија (Jeol-SEM 6400, Јапонија), големина на честички, индекс на полидисперзност (PDI) и зета потенцијал (Zetasizer Nano Series, Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., UK). Ефикасноста на

енкапсулација (EE) на лекот во НП беше определена со примена на валидиран HPLC метод, по разделување со гел филтрациона хроматографија (Sephadax G-25 column) и/или центрифугална ултрафилтрација (Vivaspin 20, 1000 kDa, Sartorius Stedim, Германија). Брзината на ослободување на лекот е следена под синк услови во PBS, во тек на 5 дена. Со примена на стандарден метод на деплеција [4] беше определена количината на F127 инкорпорирана во НП, како и последователно адсорбираната количина на F127 на површината на НП.

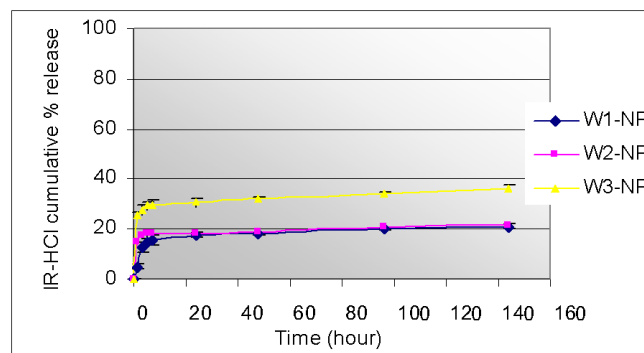
Резултати и дискусија

НП добиени со модифицирана нанопреципитација, робусен и репродукцибелен произведен процес, имаа прифатлива сферична морфологија и мазна површина. Големината на честичките, индексот на полидисперзност и EE се прикажани во Табела 2. Големината на НП кој е во ранг од 20-200 nm, обезбедува мпжност за единствена интеракција со биолошките системи на молекуларно ниво, што е во прилог на посакуваниот EPR ефект. Со оглед дека формулациите беа подготвени при идентични услови, може да се заклучи дека најверојатно иницијалната количина на F127 има влијание на големината на НП, односно, повисока концентрација резултира со помали НП. Ниските вредности на зета-потенцијалот (-1 до -5 mV) се во прилог на посакуваниот низок степен на опсонизација, со што се намалува можноста да бидат препознаени од RES, при тоа продолжувајќи го времето на престој во системската циркулација.

Табела 2. Големина, PDI, EE на НП (средна \pm SD, n = 6)

	Z-average (nm) \pm SD	PDI \pm SD	EE % \pm SD
W1-NP	125 \pm 0.1	0.108 \pm 0.020	47 \pm 2
W2-NP	124 \pm 0.2	0.104 \pm 0.023	52 \pm 3
W3-NP	112 \pm 0.1	0.110 \pm 0.018	63 \pm 3

Количината на иницијално ослободен лек зависи од составот на НП, т.е. се зголемува со зголемување на количината на F127 (Сл.1). Кинетиката на ослободување најдобро се објаснува со Korsmeyer-Perpras моделот, кој укажува дека дифузијата е главниот контролен механизам. Со оглед дека опсонизацијата и елиминацијата на НП преку RES е главна пречка за EPR ефектот, потребно е површината на НП да биде стерички стабилизирана. Ова може да се постигне со инкорпорирање и адсорпција на F127 на површината на НП. Количините на инкорпориран и адсорбиран F127, определени со метод на деплеција, се прикажани во Табела 3. Повисока иницијална количина на F127 обезбедува поголема хидрофилност на површината на НП.



Слика 1. Профил на in vitro ослободување на IR-HCl оод подготвените наночестички во PBS pH 7.4 на 37 \pm 0.5 °C (средна \pm SD, n = 3)

	mg Pluronic F127/mg PLGA	
	native NP	Adsorbed NP
W1-NP	0.48 ± 0,1	5,06 ± 0,3
W2-NP	0.69 ± 0,15	5,37± 0,3
W3-NP	1.32 ± 0,14	5,66 ± 0,4

Табела 3. Количина на инкорпориран и адсорбиран F127 на површината на НП (mg F127/mg PLGA ± SD)

ЗАКЛУЧОК

Испитувањата покажаа дека подготвените НП имаат (i) соодветна големина и површински напон (ii) ефикасна ЕЕ (iii) контролирано ослободување и (iv) стерички стабилизирана хидрофилна површина. Подготвените НП се ветувачки системи за таргетирање на цврсти тумори со помош на EPR ефект, но неопходна е понатамошна оптимизација за да се искористи нивниот целосен потенцијал. Понатамошната работа ќе биде фокусирана на соодветноста и примената на овие носачи *in vivo* на животински модели.

ЛИТЕРАТУРА

1. Maeda, H. (2001). The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting, *Adv Enzyme Regul* 41: 189-207.
2. Glavas, M., Calis, S., Simonoska M., Geskovski, N., Goracinova, K. (2011). Colloidal carriers for anticancer drug delivery – formulation aspects, *Proceedings of International Symposium on Drug Research and Development, Antalya, Turkey*
3. Simonoska Crcarevska, M., Geskovski, N., Kuzmanovska, S., Glavas Dodov, M., Calis, S., Goracinova, K. (2011). Preparation and biological evaluation of irinotecan loaded biodegradable nanocarriers for tumour delivery by EPR effect, *Proceedings of 3rd PharmSciFair, Prague, Czech Republic*
4. Shar, J. A., Obey, T. M., Cosgrove, T. (1998). Adsorption studies of polyethers Part 1. Adsorption onto hydrophobic surfaces. *Colloid Surface A* 136 (1-2): 21-33.

PHARMACY-BASED SURVEY OF PATIENT EXPERIENCES AND TREATMENT EFFECTIVENESS OF ACUTE DIARRHEA USING PROBIOTICS IN R. OF MACEDONIA

T. Sterjeva¹, K. Goracinova², M. Glavas Dodov²

¹Euro-Farm Dooel, Bitola, Macedonia

²Institute of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Ss Cyril and Methodius University, Macedonia

INTRODUCTION

Diarrhea is an increase in the frequency of bowel movements or a decrease in the form of stool and can be classified into acute and chronic. Acute diarrhea is a common problem that usually lasts 1 or 2 days and goes away on its own. The principal components of the treatment of acute diarrhea are fluid and electrolyte replacement, dietary modifications and drug therapy. Giving probiotics in conjunction with rehydration fluids reduced the duration of diarrhea by around a day and reduced the risk of diarrhea lasting four or more days by 59% (1).

Probiotics are "live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host" (WHO and FAO definition) (2). Many commercially available **products** with probiotics, which are regulated as dietary supplements and foods, consist of yeast

or bacteria. These products may contain a single microorganism or a mixture of several species. They are available as capsules, tablets, packets or powders and are also contained in various fermented foods, most commonly yogurt or dairy drinks (3). Some of the claims for which research supports a beneficial effect of probiotic consumption include: improving intestinal tract health, enhancing the immune system, synthesizing and enhancing the bioavailability of nutrients, reducing symptoms of lactose intolerance, decreasing the prevalence of allergy in susceptible individuals, and reducing risk of certain cancers. Mechanisms of action for probiotics include production of antimicrobial substances, modification of toxins, interference with attachment, stimulation of the immune system, lowering intestinal pH or a combination of above mentioned mechanisms (4).

In the previous years many probiotic products as dietary supplements have been established on the pharmaceutical market in Macedonia and they are now widely used by consumers and in clinical practice. In recent years, there has been an increasing drive to promote self-care in patients and the pharmacy profession has an opportunity to assume a key role in progressing this agenda. Therefore, the aim of this study was to investigate the patient experiences of purchasing probiotics for treatment of acute diarrhea in Macedonian community pharmacies and to explore the safety and usage pattern by collecting data from patients and their pharmacist.

METHODS

The survey was a pharmacy-based observational study in 50 community pharmacies in different regions in R. Macedonia. This descriptive study was performed on 191 patients and 92 pharmacists, interviewed on voluntary and confidential basis.

RESULTS AND DISCUSSION

In the course of the conducted study, 52% of the patients stated that they take medicines as recommended by their doctor, while 27% of the patients reported that they follow the pharmacist recommendation. Newspapers and the internet were not viewed as primary sources of advice on probiotics use in acute diarrhea treatment. Also, 88.8% of patients were familiar with the therapeutical indications, the dosing and the manner the medicine used.

Symptoms characteristic for acute diarrhea were pointed out by 60% of the patients, most of which stated that they feel these symptoms for less than two days prior to consulting a professional for assistance. Identical results have been acquired both from the surveyed pharmacist, which received the informations from their patients.

The largest percentage of the patients, 38.8%, could not locate the reason causing this symptom, 20.4% stated the common cold as a major symptom, while 15.6% of the patients reported consuming food and drinks of suspicions quality, as a symptom. Consistency in the answers provided by the patients and the pharmacist was present in these answers, as well.

For treatment of acute diarrhea, 51.6% of the patients tended to purchase over the counter medicines, while 20.4% took medicine obtained only with a prescription by a doctor. The pharmacists indicated that 51.1 % of the patients do not use another medicine for treatment of diarrhea prior to their coming in the pharmacy.

38% of the surveyed pharmacist recommend medicines that contain probiotic culture as their choice for treatment of seasonal diarrheas, and 57% of the pharmacist reported that the key factor for recommending the product is its efficacy.

As a major reason for recommendation of medicine, highest percentage of pharmacists (27.7%) stated that they make the choice on basis of

their previous positive experience with the medicine they have found out in communication with their patients and with the physician. For 37.2 % of the patients, the crucial factor for choosing of medicine is the recommendation they get from the medical professionals. The largest number of examined patients, 42%, consider that the medicines bought over the counter are safer and have less adverse effects compared to the medicines bought with a doctor's prescription.

Having completed the therapy, lasting not more than 5 days with the majority of patients, nearly 80% of respondents reported that the therapy was successful, and 86% of them had no adverse effects.

REFERENCES

1. http://www.sciencecodex.com/probiotics_shorten_diarrhea_episodes
2. G. Reid, J. Jass, M. T. Sebulsky, J. K. McCormick. 2003. Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. *Clinical Microbiology Reviews*, 16/4, 658-672.
3. N.T. Williams. 2010. Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67/6, 449-458.
4. E. Murali, B.T.V.V. Kavitha, J. Srikanth, G. Velmani. 2010. Probiotics as Potential Therapies in Human Gastrointestinal Health. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1, 96-110.

ИСКУСТВА НА ПАЦИЕНТИТЕ И ПРОЦЕНКА НА ЕФИКАСНОСТА НА ТРЕТМАНОТ НА АКУТНА ДИЈАРЕА ПРИ УПОТРЕБА НА ПРОБИОТИЦИ – ОПИСНА СТУДИЈА НИЗ ЈАВНИТЕ АПТЕКИ ВО Р. МАКЕДОНИЈА

Стерјева Т.¹, Горачинова К.², Главаш Додов М.²

¹Еуро-фарм. Дооел, Битола, Македонија

²Институт за фармацевтска технологија, Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје, Македонија

ВОВЕД

Дијареата се дефинира како зголемена фреквенција на движење на фекалните материји во дебелото црево што резултира со пореметено формирање на столицата. Дијареата може да биде акутна или хронична. Акутната дијареа е почест проблем и обично трае еден до два дена, по што симптомите постепено исчезнуваат. Третманот на акутна дијареа се состои во внесување на течности и електролити, изменет режим на исхрана и терапијата со лекови. Давањето на пробиотици, заедно со постојаната рехидратација со течности, може да го намали времетраењето на симптомите за приближно еден ден, но исто така може да го намали и ризикот од пролонгирање на состојбата, четири или повеќе денови, за 59% (1). Пробиотици се "живи добротворни микроорганизми кои кога се администрираат во соодветни количества доведуваат до здравствена придобивка за домаќинот" (СЗО и ФАО дефиниција) (2). Производите кои содржат пробиотици се достапни како додатоци на исхрана, а истите содржат квасци или бактерии. Овие производи се состојат од еден или мешавина од неколку видови микроорганизми. Комерцијално се достапни во форма на капсули, таблети или прашоци, но ги има и во различни видови на ферментирана храна, најчесто јогурт или млечни пијалаци (3). Според експертите, користењето на пробиотиците во терапија може да доведе до следниве придобивки: подобрување на состојбата на

цревниот тракт, подобрување на имунолошкиот систем, синтетизирање и подобрување на биорасположивоста на хранливите материји, намалување на симптомите на нетолерантност кон лактоза, намалување на експанзијата на алергиските реакции кај сензитивни индивидуи и намалување на ризикот од појава на одредени канцерогени заболувања. Механизмот на дејство на пробиотиците вклучува продукција на антимикробни супстанции, модификација на отровите, стимулирање на имунолошкиот систем, намалување на интестиналната рН вредност или комбинација од повеќе механизми (4).

Во изминатите години голем број на производи класифицирани како додатоци на исхраната кои содржат пробиотици се појавија на фармацевтскиот пазар во Р. Македонија, што ја поттикна и нивната широка примена од страна на потрошувачите, како и нивната примена во секојдневната клиничка пракса.

Имајќи ја во предвид се поголемата самогрижа на севкупната популација и улогата на фармацевтите во промоција и менаџирање на самолечувањето, цел на овој труд беше преку интервјуирање на пациентите и фармацевтите во јавните аптеки во Р. Македонија да се согледаат искуствата и процени ефикасноста на третманот на акутната дијареа со користење на пробиотици.

МЕТОДИ

Спроведено беше истражување, во форма на набљудувачка опасна студија, во 50 јавни аптеки од различни региони во Р. Македонија. Во истото, беа вклучени вкупно 191 пациент и 92 фармацевти, кои беа интервјуирани на доброволна основа и врз база на загарантирана доверливост.

РЕЗУЛТАТИ

Во тек на спроведената студија, 52% од пациентите се изјасниле дека лековите ги земаат по препорака на нивниот доктор, а 27% од пациентите навеле дека истите ги земаат по препорака на фармацевтот. При тоа, 88,8% од испитаниците биле точно запознаени со терапевтските индикации, дозирањето и начинот на употреба на соодветниот препарат.

Симптоми карактеристични за акутна дијареа навеле 60% од пациентите, при што најголем процент од нив се изјасниле дека истите ги чувствуваат помалку од два дена пред да побараат соодветна помош. Идентични резултати се добиени и од анкетираниите фармацевти, кои информациите ги добивале од своите пациенти.

Најголем процент од пациентите, 38,8%, неможеле да ја лоцираат причината која довела до појава на овој симптом, 20,4% од пациентите како причина ја навеле настинката, а 15,6% од пациентите како причини ги навеле конзумирањето на храна и пијалаци со сомнителен квалитет. И во овој случај забележана е конзистенција во добиените одговори од пациентите и од фармацевтите.

За третман на акутната дијареа, 51,6% од пациентите побарале да им се издадат лекови кои спаѓаат во групата на лекови кои не се издаваат со проскрипција, а 20,4% земале лекови кои се издаваат само врз основа на лекарски рецепт. Истовремено, анкетираниите фармацевти посочиле дека 51,1% од пациентите пред да дојдат во аптека не користеле друга медикаментозна терапија за третман на дијареа.

Од анкетираниите фармацевти, 38% ги препорачале препаратите кои содржат пробиотски култури, како нивен избор за третман на сезонски дијареи, при што 57% се изјасниле дека при препораката од пресудно значење е ефикасноста на препаратот.

Во однос на изборот на лекот кој го препорачуваат најголем процент од фармацевтите, 27,7%, се изјасниле дека лековите ги препорачуваат врз основа на претходно стекнатото позитивното искуство во комуникацијата со пациентите и лекарите. За 37,2% од пациентите, од пресудно значење при изборот на лекот се препораките кои ги добиваат од нивните здравствени работници. При тоа, најголем дел од анкетираниите пациенти, 42%, сметаат дека лековите кои се издаваат без рецепт се побезбедни и имаат помалку несакани ефекти во однос на лековите кои се издаваат само со лекарски рецепт.

По спроведената терапија, која кај најголем дел од пациентите се одвивала во период од 5 дена, на успех се изјасниле 79,3% од пациентите, при што 86% од нив не укажале на појава на некој несакан ефект.

РЕФЕРЕНЦИ

1. http://www.sciencecodex.com/probiotics_shorten_diarrhea_episodes
2. G. Reid, J. Jass, M. T. Sebulsky, J. K. McCormick. 2003. Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. *Clinical Microbiology Reviews*, 16/4, 658-672.
3. N.T. Williams. 2010. Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67/6, 449-458.
4. E. Murali, B.T.V.V. Kavitha, J. Srikanth, G. Velmani. 2010. Probiotics as Potential Therapies in Human Gastrointestinal Health. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1, 96-110.

QUALITY CONTROL OF RADIOPHARMACEUTICAL AGENT TECHNETIUM [99mTc] MEBROFENIN- AS A PREREQUISITE FOR ITS APPLICATION

Klimentina Trajkova¹, Aneta Dimitorvska², Emilija Janevik- Ivanovska³

¹Victoria White DOO Skopje

²University Ss.Cyril and Methodius, Faculty of Pharmacy, Skopje, Macedonia

³University Goce Delchev, Faculty of Medical Science, Shtip

INTRODUCTION

Radioactive isotopes used in nuclear medicine have a specific feature to bind to organs or lesions in the organism in the shape of highly specific radiopharmaceutical agents. The design of radiopharmaceuticals is based exclusively on the metabolic function of the targeted binding organ. The mechanisms of localization of the radiopharmaceuticals of the respective organ depend on the type of the inter-reaction, the chemical structure of the agent, as well as its distribution and metabolism. The quality of the acquired distribution, on which the interpretation of the result depends, is directly related to the quality of the radiopharmaceutical agent. The radiopharmaceutical purity of the applied agent is one of the most important elements for proper localization of the applied radiopharmaceuticals.

The most commonly used radioactive isotope for labeling radiopharmaceutical agents in the nuclear medicine clinical research is technetium [99mTc].

Tehnetium [99mTc] Mebrofenin used for hepatobiliary imaging for evaluation of hepatobiliary tract of patients to differentiate jaundice caused by hepatocellular causes, to differentiate biliary atresia from neonatal jaundice, to detect injuries of the bile.

OBJECTIVES OF RESEARCH

To make proper labeling of radiopharmaceutical product Technetium [99mTc]Mebrofenin by use of Technetium [99mTcO₄-].

To determine the quality of technetium eluate Technetium [99mTcO₄-] before its use for labeling specific radiopharmaceutical agents.

To determine the quality of Technetium [99mTc] Mebrofenin through determining the radiochemical purity according to the procedures determined by the European Pharmacopoeia and the procedures of EANM and IAEA.

To show the normal distribution in an animate model (rat).

To further show its use in clinical study during routine use.

MATERIALS AND METHODS

Technetium radiopharmaceutical [99mTc] Mebrofenin was used in the study.

» For the normal biodistribution animate model studies, rats of Wister group aged 4-12 weeks were used.

» The application of radiopharmaceutical agent was made in the tail vein in doses of 30 Mbq/0.2-1.0 ml.

» The agent was applied intravenously at patients that did not eat in the past 6 hours in adult dose of 150-300MBq/0.5-1.0ml

» Imaging was performed by gamma camera SIEMENS and the zones of accumulation were processed by using the corresponding program for gamma camera.

CONCLUSIONS

» The use of radiopharmaceutical agents in nuclear medicine is a significant progress in improving the clinical diagnosis, due to the fact that their use not only enables visualization of individual organs or tissues with characteristic morphological information, but also enables quantification of their function and metabolic activity.

» Quantitative measurement of physiological parameters as an integral part of hepatobiliary visualization by use of Technetium [99mTc] Mebrofenin is a simple, practical clinical procedure that provides detailed information on establishing a diagnosis and better therapeutic benefit.

REFERENCES

1. Degirmenci B, Durak H, Ellidokuz E, Tankurt E. Adverse Allergic Reaction to Technetium-99m-Mebrofenin. *J Nucl Med* 1989;30:1569.
2. Cordova MA, Rhodes BA, Atkins HL, Glenn HJ, Hooglund DR, Solomon AC. Adverse reactions to radiopharmaceuticals. Report of the Adverse reactions Subcommittee of the Society of Nuclear Medicine. *J Nucl Med* 1982;23:550-551.
3. Doo E, Krishnamurthy GT, Ekiem MJ, Gilbert S, Brown PH. Quantification of Hepatobiliary Function as an Integral Part of Imaging with Technetium-99m-Mebrofenin in Health and Disease. *J Nucl Med* 1991;32:48-57.
4. O.Vaskova, S.Miceva Ristevska, D. Pop Jor-eva, D. Miladinova, S. Loparska, E. Janevik Ivanovska, Osnovi na nuklearna medicina Skopje, 2008
5. O.Vaskova, S.Miceva Ristevska, D. Pop Jor-eva, D. Miladinova, S. Loparska, E. Janevik Ivanovska, V. Majstorov, A. Ugrinska, B. Andonovski, S. Kuzmanovska, A. Bogdanova, T. Josifovska, L. Muratovska, Nuklearna medicina vo klinikata praksa, Skopje 2008.

КОНТРОЛА НА КВАЛИТЕТ НА РАДИОФАРМАЦЕВТСКИ ПРЕПАРАТ ТЕХНЕЦИУМ [^{99m}Tc] МЕБРОФЕНИН-КАКО ПРЕДУСЛОВ ЗА НЕГОВА АПЛИКАЦИЈА

Климентина Трајкова¹, Анета Димитровска²,
Емилија Јаневиќ-Ивановска³

¹ Викторија Виат ДОО Скопје

² Универзитет- Св. Кирил и Методиј, Фармацевтски факултет, Скопје

³ Универзитет-Гоце Делчев, Факултет за Медицински науки, Штип

ВОВЕД

Радиоактивните изотопи кои се употребуваат во нуклеарната медицина имаат специфично дејство да се врзуваат за органите или лезиите во организмот во облик на високо специфични радиофармацевтски препарати. Дизајнот на радиофармацевтиците се базира, единствено на функционалната или метаболна активност на целиот, врзивен орган. Механизмите на локализација на радиофармацевтиците на специфичен орган зависат од видот на интер-реакцијата, хемиската структура на препаратот, како и од неговата дистрибуција и метаболизам. Квалитетот на добиената дистрибуција од која зависи и интерпретацијата на резултатот е директно врзан за квалитетот на радиофармацевтскиот препарат. Радиохемиската чистота на аплицираниот препарат е еден од најбитните елементи за соодветна локализација на употребуваниот радиофармацевтик.

Најчесто употребуван радиоактивен изотоп за обележување на радиофармацевтски препарати во нуклеарно медицинските клинички испитувања е технециум [^{99m}Tc].

Технециум [^{99m}Tc] Мebroфенин се користи за хепатобилијарна визуелизација за проценка на хепатобилијарниот тракт на пациентите, за разликување на жолтица предизвикана од хепатоцелуларни причини, за диференцијација на билијарна атресија од неонатална жолтица, за детекција на оштетувања на жолчка.

ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

- » Да се изврши правилно дефинирање на условите за обележување на радиофармацевтскиот препарат Технециум [^{99m}Tc] Мebroфенин, користејќи Технециум [^{99m}TcO₄].
- » Да се одреди квалитетот на елуатот од Технециум [^{99m}TcO₄] пред неговата употреба за обележување на специфичниот радиофармацевтски препарат.
- » Да се одреди квалитетот на Технециум [^{99m}Tc] Мebroфенин, преку одредување на радиохемиската чистота, согласно постапките дадени во Европската фармакопеја и протоколите од ЕАНМ и МААЕ.
- » Да се прикаже нормалната дистрибуција на животински модел (стаорец)
- » Да се прикаже неговата употреба во клиничката студија при рутинска употреба.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

- » Во студијата се користеше радиофармацевтски препарат Технециум [^{99m}Tc] Мebroфенин
- » За нормалните биодистрибуциони студии на животински модел беа користени стаорци од Wister група, на возраст од 4-12 недели.
- » Апликацијата на радиофармацевтскиот препарат беше во опашната вена од стаорчињата во доза од околу 30 MBq / 0.2-0.5 ml.
- » Препаратот се аплицира интравенски на пациенти кои немаат земено оброк во последните 6 часа со доза за возрасен од 150 - 300 MBq / 0.5-1.0 ml.
- » Визуелизационите студии се вршеа на гама камера SIEMENS, а зоните на акумулација се беа обработени користејќи ја соодветната програма на гама камерата.

ЗАКЛУЧОЦИ

- » Употребата на радиофармацевтските препарати во нуклеарната медицина претставува значаен напредок во унапредување на клиничката дијагностика, заради фактот што со нивното користење не се добива само визуелизација на поединечниот орган или ткива со карактеристични морфолошки информации, туку истовремено добиваме и квантификација на нивната функција и метаболна активност.
- » Мерењето на квантитативните физиолошки параметри како интегрален дел од хепатобилијарна визуелизација со употреба на Технециум [^{99m}Tc] Мebroфенин е едноставна, практична клиничка постапка која дава дополнителни информации во поставување на дијагноза и подбар терапевтски бенефит.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Degirmenci B, Durak H, Ellidokuz E, Tankurt E. Adverse Allergic Reaction to Technetium-99m-Mebrofenin. J Nucl Med 1989;30:1569.
- Cordova MA, Rhodes BA, Atkins HL, Glenn HJ, Hooglund DR, Solomon AC. Adverse reactions to radiopharmaceuticals. Report of the Adverse reactions Subcommittee of the Society of Nuclear Medicine. J Nucl Med 1982;23:550-551.
- Doo E, Krishnamurthy GT, Ekiem MJ, Gilbert S, Brown PH. Quantification of Hepatobiliary Function as an Integral Part of Imaging with Technetium-99m-Mebrofenin in Health and Disease. J Nucl Med 1991;32:48-57.
- O.Vaskova, S.Miceva Ristevska, D. Pop Jor-eva, D. Miladinova, S. Loparska, E. Janevi Ivanovska, Osnovi na nuklearna medicina Skopje, 2008
- O.Vaskova, S.Miceva Ristevska, D. Pop Jor-eva, D. Miladinova, S. Loparska, E. Janevi Ivanovska, V. Majstorov, A. Ugrinska, B. Andonovski, S. Kuzmanovska, A. Bogdanova, T. Josifovska, L. Muratovska, Nuklearna medicina vo klinickata praksa, Skopje 2008.

WATER INTRUSION TEST, ADVANTAGE AND PRACTICAL ASPECTS

Kukeska Silvana, Tomovska Elena,
Gligorova Milkica

Alkaloid AD

INTRODUCTION

The Water Intrusion Test (WIT or Water Flow Test, WFT), was introduced a number of years ago and has been adopted by a small number of filter users looking for a method that eliminates the requirement for the introduction of a 'contaminant' such as IPA (Isopropylalcohol). The test has been designed for hydrophobic sterile gas filters. The fact that only DI / WFI grade water is used during the WI test and the membrane is not 'wet out' means that in principle it is a very attractive test method and have many advantages from the other tests.

OBJECTIVE

Presenting and alerting of the advantages and the practicality of the new test for hydrophobic filters, Water Intrusion Test, and comparison with other tests (diffusion or Forward Flow Test, FF).

Methods: Integrity testing of hydrophobic gas (air and nitrogen) filters using Forward Flow and Water Intrusion Test. Performance: filling the upstream side (direction of filtration) of a dry, hydrophobic filter with suitable liquid, application of the proper pressure and automatic flow measuring (integrity test apparatus).

Results: The Forward Flow Test is used for testing of hydrophobic filters only if the filter membrane is fully wetted with wetting agent. This is possible if the surface tension of the wetting agent is less than the critical surface tension of the filter material being used. For that objective, different organic solvents like ethanol or solvent (isopropanol)/water mixtures are used as practical wetting media. This aspect is especially important and detrimental when the system is used as a "sterile air filter" for venting tanks, bioreactors and fermenters. In this case, in situ integrity testing with Forward Flow Test is limited because of security reasons (flammability and explosive protection from organic solvents) and because of keeping the cleanliness of the filter/filtrated product. If the filters should be retested with Forward Flow Test immediately after in-line steam sterilization, tests with a solvent|water mixture are impractical. If the testing is performed off-line, it is necessary to clean the filter with a validated process of cleaning, subsequently after testing, because of the potential contamination with organic solvent residues.

The Water Intrusion Test is non-destructive, reproducible and allows in-place testing of hydrophobic filters, immediately after sterilization, without the danger of filter and product contamination. It is performed using water for injection, applicated on the upstream side of the filter membrane. It does not use organic solvent/water mixtures as wetting liquid. It is not required any manipulation on the downstream filter side. So, problems like eliminating solvent from the medium, are not present in this test, and there is no risk of potential residue and contamination. The hydrophobicity of the filter stays during the test and also, it is evaluated with the test (detection of potential hydrophilisation). WIT is a high sensitive test and directly correlated with ASTM bacterial challenge test.

The principle of WIT is a capillar depression of the non-wetting liquid placed on the outer side of the filter membrane, or measuring the pressure decay, applicated on the hydrophobic membrane which is en-

veloped with water cover. Pressure gradient that is dependent on pore size is necessary to overcome negative capillary forces (cohesive forces). This pressure is generally called "Intrusion" or the "Water Penetration Point" (WPP), the pressure at which water is pressed through a hydrophobic membrane. The practical performance of the test is the same like the diffusion test, but the principle is different. In the Forward Flow Test, the gas flow which diffuse through the wetted membrane is measured. The Water Intrusion Test measure the volume of water which is intruded in the membrane matrix. Two main reasons are responsible for registered pressure drop in this testing. The first one is the compaction process, compression of the membrane structure and passage of the trapped air (stabilization test time). And the second one is evaporation of the water molecules through the filter pores. If the membrane is damaged (punctured), the water leaks through the holes. The test is very sensitive and a little pressure drop (higher flow), detects damaged filter structure.

Conclusions: In-line Forward Flow Test of hydrophobic sterile gas filters is impractical. For off-line diffusion testing, validation of the cleaning process after the test, is required. The security risk factor is pointed out in both cases.

The Water Intrusion Test is practical, non-contaminating and safe for integrity testing of hydrophobic sterile gas filters.

REFERENCES:

1. Pall Corporation, The Pall Water Intrusion Test for Integrity Testing Sterile Gas Filters, Publication No.: USTR 1603
2. Sartorius, Water Intrusion Test, Publication No.: SP-4504-e04014
3. Jornitz M. W., Levy R.V., Madsen R. E., Meltzer T. H., Reif O.W., Sterile Filtration, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006

ТЕСТ НА ВОДЕНА ИНТРУЗИЈА, ПРЕДНОСТ И ПРАКТИЧНИ АСПЕКТИ

Кукеска Силвана, Томовска Елена, Глигорова
Милкица

Алкалоид АД

ВОВЕД

Тестот на водена интрузија (WIT, Water Intrusion Test, или WFT, Water Flow Test), е претставен пред неколку години кога беше адаптиран за употреба кај мал број на корисници на хидрофобни филтри, кои бараа метод за тестирање без употреба на контаминанти, како на пример, изопропил алкохол (IPA). Тестот е дизајниран за тестирање на стерилни, хидрофобни, вент филтри. Фактот дека за време на овој тест се користи само дејонизирана/вода за инјекции, а при тоа, хидрофобната мембрана не се наводенува, значи дека принципот на тестот е многу атрактивен и со повеќе предности во однос на други типови на тестови.

ЦЕЛ

Презентирање и укажување на предностите и практичноста на новиот тест за хидрофобни филтри, тест на водена интрузија, и споредба со други тестови (дифузишки тест или Forward Flow Test, FF).

Методи: Тестирање на интегритет на хидрофобни филтри за гасови (воздух и азот) со дифузишки тест и тест на водена интрузија. Начин

на изведба: полнење на upstream страната на сув, хидрофобен филтер (насока на филтрација) со соодветна течност, апликација на пропишан притисок и автоматско мерење на проток (инструмент за тестирање на интегритет).

Резултати: Дифузискиот тест се употребува за тестирање на хидрофобни филтри, само ако мембраната на филтерот е комплетно навлажнета со навлажнувачки агенс, а тоа е возможно ако површинскиот напон на агенсот е помал од критичниот, површински напон на филтерскиот материјал. За таа цел, се употребуваат различни органски растворувачи, на пример етанол или микстури на органски растворувачи (изопропанол) и вода. Овој аспект е особено важен и детерминирачки кога филтрациониот систем се користи за стерилна филтрација на воздух во танкови, биореактори и ферментори. Во ваков случај, дифузискиот тест на интегритет на лице место (in situ), е лимитиран од безбедносни причини (запаливост и експлозивна заштита при тестирање со органски растворувачи) и заради задржување на чистотата на филтерот/филтрираниот продукт. Ако филтрите треба да се ретестираат веднаш после in-line стерилизација, тестовите со солвент/вода микстури се непрактични. Ако тестирањето се изведува off-line, неопходно е, последователно да се изведе валидиран процес на чистење на филтерот после тестирање, заради можноста од контаминација со резидуи од органски растворувач.

Тестот на водена интрузија е недеструктивен, репродуктивен и овозможува тестирање на хидрофобни филтри (inplace), веднаш после стерилизација, без никаква опасност од контаминација на филтерот и продуктот за филтрација. Се изведува со употреба на вода за инјекции која се аплицира на upstream страната на филтерската мембрана, значи без употреба на смеси на органски растворувачи и вода. Не се потребни никакви манипулации на downstream страната на филтерот. Оттаму, елиминирани се проблеми при отстранување на растворувач од филтрациониот медиум после тест, не постои ризик од можен остаток на резидуи и контаминација. Хидрофобноста на филтерот се задржува за време на тестот и истата се евалуира со тестот (детекција на можна хидрофилизација). WIT е високо сензитивен тест и директно корелира со ASTM тестот на бактериски предизвик.

Принципот на WIT е капиларна депресија на ненавлажнувачка течност на надворешната страна на филтерската мембрана односно, мерење на падот на притисокот, изложен на хидрофобната мембрана која претходно е покриена со водена обвивка. Градиент на притисокот, кој што е зависен од големината на порите, е неопходен, за да ги надмине негативните капиларни сили (кохезија). Овој притисок е интрузионен или притисок на пенетрација на водата (WPP, Water Penetration Point). Практичната изведба на тестот е иста како за дифузискиот тест. Меѓутоа, во однос на принципот, кај дифузискиот тест се мери протокот на гасот што дифундира преку навлажнетата мембрана, додека кај тестот на водена интрузија се мери волуменот на вода која интудира (се набива) во мембранозниот матрикс. Падот на притисокот што притоа се регистрира, е од две причини. Првата е процесот на компактирање, компресија на мембранската структура и пасажа на заробенит воздух (време на стабилизација во тестот), а втората главна причина е евапорација на водени молекули преку порите на филтерот. Ако мембраната е оштетена (пунктурирана), водата главно истекува низ отворите. Тестот е многу сензитивен и мал пад на притисокот (зголемен проток), детектира нарушена филтерска структура.

Заклучоци: In-line дифузискиот тест на хидрофобни, стерилни, вент

филтри е непрактичен. За off-line дифузиски тест, неопходна е валидација на чистење после тестирање. Безбедносниот ризик фактор е нагласен во двата случаи.

Тестот на водена интрузија е практичен, неконтаминирачки и безбеден за тестирање на интегритет на хидрофобни, стерилни, вент филтри.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА:

1. Pall Corporation, The Pall Water Intrusion Test for Integrity Testing Sterile Gas Filters, Publication No.: USTR 1603
2. Sartorius, Water Intrusion Test, Publication No.: SP-4504-e04014
3. Jornitz M. W., Levy R.V., Madsen R. E., Meltzer T. H., Reif O.W., Sterile Filtration, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006



КЛИНИЧКА ФАРМАЦИЈА
орални презентации

CLINICAL PHARMACY
oral presentations

INTRAVENOUS IMMUNOBLOBULIN IN THE TREATMENT OF NEUROLOGICAL DISEASES

Slobodan Apostolski

Outpatient Neurological Clinic, Belgrade, Serbia

Intravenous immunoglobulin (IVIG) preparations are produced from a pool of more than 5000 healthy donors. IVIG contain IgG antibodies against a wide spectrum of normal human proteins and anti-idiotypic antibodies directed against Fab, the antigen-binding region of these antibodies. 40% of the IgG molecules form dimers by double-arm or single-arm binding between their F(ab')₂ domains. The dimers represent complexes of idiotypic-anti-idiotypic antibodies. The larger the pool of donors, the higher the number of the F(ab')₂ dimeric pairs and the wider the expected spectrum of idiotypic-anti-idiotypic specificities. Preparations of IVIG also contain immunomodulating peptides (soluble CD4, CD8 and human leucocyte antigen molecules) and antibodies against exogenous antigens, viruses, and bacteria. Immunomodulating action of IVIG is mediated by the effect on B cells, antibodies, T cells and complement system. IVIG have influence on molecular mechanism involved in cell migration, suppresses the proinflammatory cytokines and promote remyelination. The main effect of IVIG on humoral immunity is composed Fc-mediated inhibition of antibody production and neutralization of autoantibodies by anti-idiotypes. IVIG bind to complement components C1, C3b, and C4, increase degradation of C3b, and bind of anaphylatoxins C3a and C5b. Mechanisms of IVIG that influence the T cells include antibodies against T-cell receptor β -chain, antibodies against CD4 and CD8, soluble CD4 and CD8, antibodies against HLA molecules, superantigens, and antibodies against chemokine receptor CCR5. IVIG modulate the expression of adhesion molecules (ICAM) and have antibodies against integrins, RGD motif, and antibodies against CCR5 affecting the cell migration. IVIG inhibit T cell activation by inhibition of maturation of dendritic cells. Proinflammatory cytokines interleukin-1, tumor necrosis factor- α and interferon- γ are suppressed by IVIG. IVIG have been successfully used to treat a number of immune-mediated diseases of the central and peripheral nervous system as well as immune mediated muscle diseases. IVIG have been used as a first-line therapy in: Guillain-Barré syndrome (GBS), chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP), multifocal motor neuropathy (MMN), and dermatomyositis (DM). IVIG may be used also in neuromuscular junction diseases (myasthenia gravis, myasthenic syndrome), multiple sclerosis (MS), Rasmussen's encephalitis (RE), Stiff-person syndrome (SPS), and Post-polio syndrome. IVIG treatment should be administered in a dose of 2 gr/kg given over 2-5 days and it could be sufficient therapy for an acute neurological diseases (GBS, myasthenic crisis). In patients with chronic diseases (CIDP, MMN, DM, MS...) repeated IVIg treatment should be considered and the frequency of IVIG maintenance therapy should be guided by the response. Typical treatment regimens are 1 g/kg every 2-4 weeks, or 2 g/kg every 1-2 months. Patients with selective IgA deficiency and anti-IgA antibodies are at risk to develop an anaphylactic shock due to IgA contaminations in the IVIG preparation. A general screening for IgA deficiency prior to IVIG infusion is thought to be not necessary. In cases with known hypersensitivity reactions it is recommended to administer 1-2 mg/kg of hydrocortisone intravenously approximately 30 min before IVIG infusion. Side effects of IVIG include mild headache which occurs in 30% of treatment courses. Severe adverse events (thrombosis of the jugular vein, allergic reaction, retrosternal pressure) leading to discontinuation of the treatment were noted in 4% of all treatment courses.

CONGENITAL MALFORMATIONS AND PHARMACOLOGICAL TREATMENT OF EPILEPSY IN PREGNANCY

Gordana Kiteva-Trencevska

*University clinic of neurology, Skopje, R. Macedonia***INTRODUCTION**

Pregnant women with epilepsy are confronted with 3 major risks: the risk that maternal seizures during pregnancy could do harm to mother and embryo or foetus; the risk of the potential teratogenic effects of antiepileptic drugs (AEDs); and the genetic risk of the maternal disease-epilepsy, if caused in part by genetic predisposition. Pregnant women with epilepsy and their doctors are faced with the need to balance the teratogenic risks resulting from seizures during pregnancy against the risks of taking AEDs to prevent seizures. AEDs of the first generation (phenobarbital, phenytoin, and primidone) and the second generation (valproate, carbamazepine) were all found to be more or less teratogenic. The human teratogenic potential of newer antiepileptic drugs (clobazam, felbamate, gabapentin, lamotrigine, levetiracetam, oxcarbazepine, tiagabine, topiramate, vigabatrin, zonisamide, etc.) is still under evaluation. Some women with epilepsy need to be treated with more than one antiepileptic drug. This increases the number of different treatment regimens. So a great number of cases are needed for better understanding of the connection between AEDs, epilepsy and teratogenicity. The results of pre-clinical toxicological studies of teratogenicity in at least two different species are difficult to extrapolate to the humans, because of the well-known interspecies differences in teratogen susceptibility, partly determined by differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. Furthermore, combinations of antiepileptic drugs are not tested pre-clinically, although metabolic interactions between individual components of such drug combinations may affect teratogenic risks. That is why EURAP is started as an international observational cohort study of AEDs and teratogenicity in pregnant women. R. Macedonia is contributing in this international project reporting pregnancies from R. Macedonia according the EURAP study protocol.

The aim of this paper is to report the congenital malformation outcome in pregnant women with epilepsy from R. Macedonia.

MATERIAL AND METHODS

The EURAP epilepsy and pregnancy registry is an observational cohort study representing a collaboration of physicians from 42 countries. We report cases from R. Macedonia. We prospectively monitored 84 pregnancies exposed to AEDs as monotherapy or polytherapy with different doses of common AEDs registered for use in R. Macedonia. In this paper our primary aim is to evaluate the major congenital malformations detected up to 12 months after birth. We assessed pregnancy outcomes

according to AEDs, as monotherapy or polytherapy, use of folic acid supplementation, exposure to alcohol, smoking, X-rays. Evaluation of risk factors includes, among others: maternal age at conception, maternal educational level, type, dose, and administration schedule of antiepileptic drugs, type and aetiology of maternal epilepsy, onset and duration of epilepsy, type and frequency of seizures during pregnancy, other chronic or intercurrent maternal diseases, family history of major malformations, known hereditary diseases, and

epilepsy among first-degree relatives of the foetus.

RESULTS

After excluding pregnancies that ended in spontaneous abortions or induced abortions we assessed pregnancy outcome concerning major congenital malformations in 84 pregnancies from R. Macedonia. Major congenital malformations were found in 3 pregnancies, one of them being a first pregnancy and the others being second pregnancies, with an outcome of a healthy child in the first pregnancy in both. The first pregnancy that ended in a male newborn with tetralogia Fallot happened in a mother with idiopathic generalized epilepsy (IGE) taking once daily 100 mg phenobarbiton. She was seizure free during pregnancy from GTCS or other seizures, but she used folan supplementational treatment of 5 mg only during one month in the first trimester. She was exposed to alcohol, and smoking up to 10 cigarettes per day. Her second pregnancy was a healthy female child. During her second pregnancy she was using valproate immunotherapy, 5 mg folan supplementation during whole pregnancy and was not exposed to smoking and alcohol. The outcome of the second pregnancy in one patient was a female newborn with polydactylia, a sixth finger coming up from the first finger on the hand on both sides. The mother of this newborn had a healthy male child from her first pregnancy. She had cryptogenic temporal lobe epilepsy, without seizure control. She manifested partial complex seizures during pregnancy with a frequency of a few in a month. She used AED polytherapy. The outcome of the second pregnancy in the other patient was lumbal meningomyelocela. She had IGE and was seizure free on valproate 300 mg twice daily during second pregnancy, but she was using folan supplementation of 0,4 mg only instead of 5 mg that she was using during her first pregnancy with a favourable outcome.

CONCLUSION

The risk of major congenital malformations is influenced not only by type of antiepileptic drug, but also by other variables, which should be taken into account in the management of epilepsy in women of childbearing potential.

КОНГЕНИТАЛНИ МАЛФОРМАЦИИ И ФАРМАКОЛОШКИ ТРЕТМАН НА ЕПИЛЕПСИИ ПРИ БРЕМЕНОСТ

Гордана Китева-Тренчевска

Универзитетска клиника за неврологија, Скопје, Р. Македонија

ВОВЕД

Кај трудниците со епилепсија постојат 3 главни ризици: ризик од епилептични напади при бременост кои може да и наштетат на мајката, на ембрионот или на фетусот; ризик од потенцијален тератоген ефект од антиепилептичните лекови (АЕЛ) и генетски ризик за пренесување на болеста од мајката - епилепсијата, ако епилепсијата е причинета и од генетска предиспозиција. Трудниците со епилепсија и нивните доктори се соочени со потребата да го балансираат тератогениот ризик што може да го имаат нападите за време на бременост со тератогениот ризикот од земање АЕЛ кои треба да ги спречат нападите. АЕЛ од првата генерација (фенобарби-

тон, фенитоин и примидон) и од втората генерација (валпроат и карбамазепин) се покажаа како терапогени, повеќе или помалку. Тератогениот потенцијал за човекот на новите АЕЛ (клобазам, фелбагат, габапентин, ламотригин, леветирацетам, окскарбазепин, тиагабин, топирамат, вигабатрин, зонисамид и др) сè уште се евалуира. Некои жени со епилепсија треба да примаат повеќе од еден АЕЛ. Ова го зголемува бројот на различни тераписки комбинации. Затоа е потребен голем број на случаи за да се разбере подобро врската помеѓу АЕЛ, епилепсијата и тератогеноста. Резултатите од пред-клиничките токсиколошки студии за тератогеноста добиени од барем две различни врсти организми тешко може да се екстраполираат кај луѓе, поради добро познатите разлики во тератогениот ефект кај различни врсти организми, делумно детерминирани од различната фармакокинетика и фармакодинамика. Покрај тоа, разни комбинации на АЕЛ не се тестираат пред-клинички, иако метаболичките интеракции на поедините компоненти на комбинираниите АЕЛ може да имаат влијание на тератогениот ризик. Затоа е започната студијата наречена ЕУРАП (European registry of antiepileptic drugs and pregnancy), интернационална обсервациска кохортна студија за АЕЛ и тератогеност кај трудници. Република Македонија е вклучена во овој интернационален проект со испраќање на резултати од бремености од Р. Македонија, согласно протоколот на ЕУРАП студијата.

Целта на овој труд е да се прикаже исходот од бременоста во однос на појавата на конгенитални малформации кај трудниците со епилепсија од Р. Македонија кои користат АЕЛ за време на бременоста.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

ЕУРАП студијата за епилепсија и бременост е интернационална обсервациска кохортна студија во која учествуваат доктори од 42 земји. Ние ги изнесуваме резултатите од случаите од Р. Македонија. Мониторирани беа проспективно 84 бремености изложени на дејство на АЕЛ, лекови кои се регистрирани за користење во Р. Македонија, било како монотерапија или политерапија, со различни дози. Во овој труд имаме за цел да ги изнесеме мајорните конгенитални малформации детектирани до првата год по раѓањето. Ние го евалуираме исходот од бременоста во однос на АЕЛ, како монотерапија или политерапија, во однос на употребата на фолан дополнителна терапија, во однос на изложеност на алкохол, цигари, "x" зрачење. Евалуацијата на ризик факторите вклучуваше меѓу другото: возраста на мајката при концепцијата, нивото на образование на родителите, АЕЛ со дозата и ритамот на дозирање, типот и етиологијата на епилепсијата кај мајката, почеток и траење на епилепсијата, типот на напади и нивната фреквенција за време на бременоста, постоење на други хронични и интеркурентни болести кај мајката, фамилијарната историја за конгенитални мајорни малформации, познати херeditарни болести и епилепсија меѓу првостепените роднини на фетусот.

РЕЗУЛТАТИ

Откако ги исклучивме бременостите кои завршија со спонтани или индуцирани абортуси, ние ги анализираме исходите на бременоста во однос на појата на мајорни конгенитални малформации кај 84 бремености од Р. Македонија.

Мајорни конгенитални малформации беа најдени кај 3 бремености, од кои кај едната се работеше за прва бременост, а кај другите две се работеше за втора бременост, со здрави деца како исход од првите бремености во овие два случаи. Првата бременост која заврши со машко новороденче со мајорна конгенитална малформација tetralogia Fallot се случи кај мајка со идиопатска генерализира-

на епилепсија (ИГЕ) која земаше АЕЛ и тоа фенобарбитон таблети со еднократно дневно дозирање од 100 мг. Мајката имаше контрола на нападите, за време на бременоста немаше епилептични напади од типот на генерализирани тонично-клонични или други напади, но користеше дополнителна терапија на таблети фолан од 5 мг само во текот на еден месец од првото тромесечие на бременоста. Таа за време на бременоста користела алкохол и пушела од неколку до 10 цигари дневно. Нејзината втора бременост беше здраво женско новороденче. За време на втората бременост мајката користеше валпроат монотерапија како антиепилептична терапија, додатна терапија на фолан од 5 мг за време на целата бременост и го прекина потполно користењето на алкохол и цигари за време на бременоста. Кај вториот случај, исходот од втората бременост на една од мајките беше женско новородено со конгенитална малформација од видот на полидактилија, со појава на шести прст на двете шаки кој поаѓаше од палецот. Пврата бременост на оваа мајка заврши со раѓање на здраво машко дете. Таа имаше криптогена форма на темпорална епилепсија, без контрола на нападите. За време на бременоста таа манифестираше комплексни парцијални напади со честота од неколку напади месечно. Таа користеше политерапија од АЕЛ. Исходот на втората бременост кај третиот случај на бременост со мајорни конгенитални малформации резултираше со лумбална менингомиелоцела. Мајката имаше ИГЕ со контрола на нападите со АЕТ валпроат во дозирање од по 300 мг два пати дневно и користење на дополнителна терапија на фолан од 0,4 мг дневно, наместо 5 мг фолан дневно како што користела за време на првата бременост со поволан исход.

ЗАКЛУЧОК

Ризикот од мајорни конгенитални малформации кај бремени со епилепсија кои користат АЕЛ не е само под влијание на видот на АЕЛ, но зависи и од други фактори кои треба да се земат во обзир при менежирањето на епилепсијата кај жени во генеративниот период.

OPTIMIZATION OF ELISA METHOD FOR DETERMINATION OF SERUM ANTI-GM1 ANTIBODIES

Ana Poceva Panovska¹, Katerina Brezovska¹, Aleksandra Grozdanova¹, Slobodan Apostolski², Ljubica Suturkova¹

¹Faculty of Pharmacy, University Ss. Cyril and Methodius, Skopje, Macedonia

²Outpatient Neurological Clinic, Belgrade, Serbia

INTRODUCTION

Anti-ganglioside antibodies (anti-GAb) assays have been widely used as a research tool in studying autoimmune peripheral neuropathies [1]. Quantification of circulating antibodies has been suggested as useful for diagnosis, since there is well-known correlation between specific neuropathies and anti-GAb [1-4]. Titer of these antibodies is used as a predictive marker in Guillain-Barre syndrome (GBS), since high concentration predicts a severe course and poor prognosis of the disease. In some neuropathies such as multifocal motor neuropathy (MMN), anti-GAb are response analyte for monitoring the therapy. Patient with

a therapeutic reduction in anti-GAb concentration has been associated with clinical improvement [1-5]. These antibodies are routinely measured by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) that detects serum antibodies binding to ganglioside coated well. Usually confirmation of a positive serum is done using thin layer chromatography with subsequent immunodetection [4]. There are several other alternatives such as agglutination immunoassay that detects antibody binding to ganglioside-coated microspheres [6] and dot or line immunoassay that may be a good alternative for the multiparametric determination of anti-GAb [7].

There are reported variation of the results obtained by ELISA method for different patient groups and controls. These variations could largely be explained by differences in established in-house protocols based on the previously published assays methods. Many factors that influence the assay have been identified. They include ganglioside source, types of ELISA plates used, coating methods, secondary reagents and other differences in protocol details [8].

In order to obtain reliable protocol for determination of anti-GM1 anti-ganglioside antibodies we optimized the existing in-house protocol and established the cut off values for IgG and IgM antibodies using receiver-operating characteristic (ROC) analysis.

EXPERIMENTAL

On a standard 96-well plate each well in the rows A,C,E and G was coated with 200 ng GM1 in 100 µl absolute ethanol. Wells in the remaining rows were coated with the solvent and it was left to evaporate at the room temperature (RT). Blocking of nonspecific binding sites was done with 1% BSA in PBS for 2 hours at 4 °C. Wells were washed with 0.1% BSA/PBS. The test sera (1:200) were added in duplicate, serially diluted to 1:6400 and incubated over night (ON) at 4 °C. Plates were washed (0.1% Tween 20 in 0.1% BSA/PBS) and peroxidase conjugated goat anti-human IgG (1:1000) was added to the wells and incubated for 2 hours at 4 °C. After washing color was developed by adding 100 µl of substrate solution (0,25 mg/ml OPD in citrate buffer) and 30% H₂O₂ and after 20 min reaction was stopped with 3M H₂SO₄ and absorbance was read at 490 nm. As a control for GM1 well coating biotinylated cholera toxin (CT) was used.

To determine anti-GM1 reactivity, the mean difference of optical densities (d-OD) of two GM1-coated wells and two uncoated wells was used. To evaluate cut-off values for positive IgM and IgG anti-GM1 reactivity, a ROC curve was made using MedCalc® v11.6 software. The ROC-curves were based on the available d-OD results of 24 MMN patients for IgM and 24 GBS patients for IgG since these patient subgroups show relative highest and most frequent reactivity for these isotypes in the literature and in this study [9]. To determine the ROC-curves, the d-OD results of 24 blood donors were used as a control group (HC) for both isotypes. The reciprocal of the highest dilution that resulted in an OD higher than the cut-off value was taken to be the titer.

RESULTS AND DISCUSSION

Assay optimization

For the optimization of ELISA procedure different factors were analyzed. The major problem of the existing protocol was high background (absorbance of the sera added to wells without ganglioside) that interfered with the correct estimation of the specificity and sensitivity of the antibodies.

In the present study we used flat bottom-high binding microtiter plates. Absolute ethanol was selected as a suitable solvent for coating since it is the most exploit in the literature and it gives more repro-

ducible results.

The optimal antigen coating concentration and dilution of secondary antibody was determined using checkboard titration and set at 0.2 µg/100µl per well for GM1 and dilution of 1:1000 for secondary antibody.

Various concentrations of PBS-BSA blocking solution were examined and the optimal was set to 10g/L.

In the washing steps after varying the concentration of the detergent Tween 20 it was established that 0.1% of the detergent in 0.1% BSA/PBS optimally reduces the background absorption.

Determination of cut-off values

The ROC analysis was performed to determine the optimal cut-off values for positive IgG and IgM anti-GM1 reactivity and to discriminate between patients and controls. As a negative state variable we used results of the d-OD from HC and as positive state variable, results of d-OD for IgM and IgG obtained from patients with MMN and GBS, respectively (Fig. 1). ROC analysis indicated a corresponding specificity of 100% for IgM and a specificity of 100% for IgG with sensitivities of 46% and 21%, respectively. The area under the ROC curve for IgM was 0.78 and for IgG 0.67.

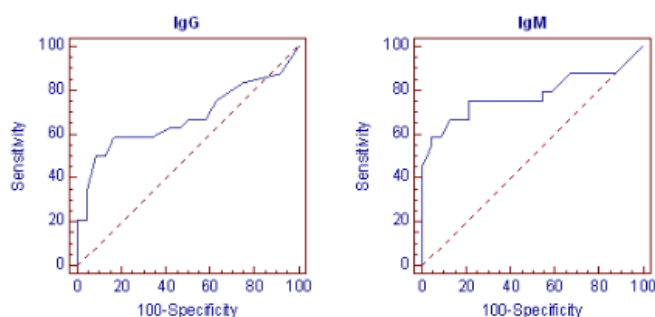


Fig 1. ROC curves for anti-GM1 reactivity

The optimal cut-off value based on the ROC analysis was set to 0.3 for IgM and 0.2 for IgG. Lower cut-off values will increase the sensitivity but also will result in an unwanted higher false positive fraction. We recommend a lower false positive fraction in favor of a higher sensitivity.

CONCLUSION

We optimized ELISA method for determination of serum anti-GM1 antibodies that can be used as a diagnostic tool for immune-mediated peripheral neuropathies.

REFERENCES

- [1] Adams D, Kuntzer T, Burger D, Choffon M, Magistris MR, Regli F, Steck AJ (1991) *J Neuroimmunol* 32 223-230
- [2] Sadiq SA, Thomas FP, Kilidireas K, Protopsaltis S, Hays AP, Lee KW, et al. *Neurology* 1990;40:1067-72.
- [3] Berg LH, Marrink AEJ, Jong HJ, Imhoff GW, Latov N, Sadiq SA. *J Neurol Neurosurg Psych* 1992;55:8-11.
- [4] Willison HJ, Yuki N. *Brain* 2002;125(Pt 12):2591-625.
- [5] Feldman EL, Bromberg MB, Alberes JW, Pestronk A. *Ann Neurol* 1991;30:397-401.
- [6] Alaedini A, Latov N. *J Clin Lab Anal* 2001;15:96-9
- [7] A New Line Immunoassay for the Multiparametric Detection of Antiganglioside Autoantibodies in Patients with Autoimmune Peripheral Neuropathies
- [8] Ravindranath MH, Ravindranath RM, Morton DL, Graves MC 1994 Factor affecting the fine specificity and sensitivity of serum antiganglioside antibodies in ELISA, 169: 257-72
- [9] Kuijff M, van Doorn P, Tio-Gillen A, Geleijns K, Ang W Hooijkaas H, Hop W. *Jacobs B* (2005) *J Neurol Sci*, 239; 37 - 44
- [10] Bech E, Jakobsen J, Orntoft T, ELISA-Type Titertray Assay of IgM anti-GM1 autoantibodies (1994) *Clin Chem* 40/7, 1331-4

ОПТИМИЗАЦИЈА НА ELISA МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА СЕРУМСКИ АНТИ-GM1 АНТИТЕЛА

Ана Поцева Пановска¹, Катерина Брезовска¹, Александра Грозданова¹, Слободан Апостолски², Љубица Шутуркова¹

¹Фармацевтски Факултет, Универзитет Св Кирил и Методиј, Скопје, Македонија

²Специјалистичка ординација за неврологија 'Апостолски', Белград, Србија

ВОВЕД

Тестовите за определување на анти-ганглиозидни антитела (анти-GAb) имаат широка примена во истражувањата на автоимуните периферни невропатии [1]. Квантификацијата на анти-GAb е особено корисна кај невропатии за кои е докажано постоењето на корелацијата со анти-GAb [1-4]. Титарот на анти-GAb може да се користи како предиктивен маркер. Кај Guillain-Barré синдромот (GBS), високиот титар на анти-GM1 антителата, корелира со тежок тек и лоша прогноза на болеста. Кај некои невропатии како мултифокалната моторна невропатија (MMN), анти-GAb се анализира преку кој може да се следи исходот од терапијата. Пациентите кај кои во текот на терапијата доаѓа до редукција на анти-GAb генерално имаат подобра клиничка слика [1-4].

Определувањето на анти-GAb рутински се изведува со ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Најчесто за потврда на позитивниот серум може да се користи тенкослојна хроматографија со имунотест [4]. Постојат и други методи за определување на анти-GAb како аглутинацискиот имунотест [6] и 'dot' или 'line' имунотестот [7].

Разлики во резултатите за анти-GAb добиени со ELISA кај различни групи на пациенти и контроли, главно се должат на разликите во воспоставените 'in-house' лабораториски протоколи. Некои од факторите кои влијаат на резултатите од тестот се различното потекло на ганглиозидите, различни типови на ELISA плочи, методи на обложување на плочите, секундарни реагенси и други разлики во деталите на изведување на постапката [8].

Со цел да се добие сигурен протокол за определување на анти-GAb оптимизиран е постоечкиот лабораториски протокол и определени се граничните вредности на отфрлање (cut-off) на тестот за IgG и IgM антителата користејќи ROC (Receiver-Operating Characteristic) анализа.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ

ELISA постапка

На плоча со 96 бунарчиња редовите А,С,Е и G беа обложени со 200 ng GM1/100 µl абсолютен етанол. Во преостанатите редови додаден е само етанол. По упарување на истиот преку ноќ (ON), на собна температура, бунарчињата се блокирани со 1% BSA/PBS, 2 ч на 4°C. По миене со 0,1% BSA/PBS, во дупликат се додадени серумите (од 1:200 до 1:6400) и инкубирани ON на 4°C. По миене (0.1% Tween 20 / 0,1% BSA/PBS) додаден е пероксидаза конјугиран античуман IgG (1:1000) и плочите се инкубирани 2 ч на 4°C. По миене бојата е развиена со додавање на субстратен раствор (0.25 mg/ml о-фенилен диамин) и 30% H₂O₂. По 20 min реакцијата е стопирана со 3M H₂SO₄ и абсорбацијата е измерена на 490 nm. Како контрола за оптималното обложување на бунарчињата користен е колера

токсин како специфичен маркер за GM1.

За да се определат анти-GM1 реактивноста користена е средната вредност од разликата на оптичките густини (d-OD) од две бунарчиња обложени со GM1 и две необложени. За да се определат cut-off вредностите за позитивната IgM и IgG анти-GM1 реактивност, конструирана е ROC крива со помош на статистичкиот софтвер MedCalc®. ROC-кривите се конструирани врз основа на добиените d-OD од 24 пациенти со MMN за IgM и 24 пациенти со GBS за IgG, бидејќи овие субгрупи на пациенти покажуваат релативно највисока и најчеста реактивност за соодветните изотиповите во литературата и во нашите досегашни истражувања [9]. Во ROC-кривите, резултатите од d-OD од 24 здрави дарители се користени како контролна група за двата изотипа.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Оптимизација на методот

При оптимизација на ELISA постапката за определување на анти-GAb анализирани се неколку фактори. Главниот проблем во постоечкиот протокол беше високата вредност на позадинската абсорпција на бунарчињата без антиген, која интерферираше со специфичноста и осетливоста на антителата.

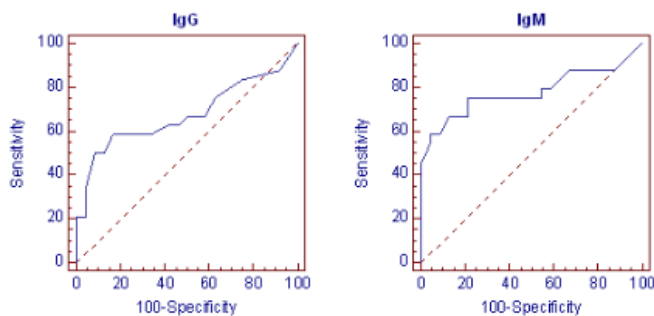
Во испитувањата користени се микротитарски плочи со бунарчиња со рамно дно и висок афинитет. Како растворувач за обложување избран е абсолютен етанол бидејќи истиот е најчесто користен во литературните податоци и дава репродуцибилни резултати во нашите испитувања.

Оптималната концентрација на GM1 и дилуцијата на секундарното антитело е определена со титрација и изнесува 0,2 µg/100µl на бунарче за GM1 и разредување од 1:1000 за секундарното антитело. Од растворот за блокирање (BSA-PBS) испитувани се различни концентрации при што за оптимална е определна концентрацијата од 10 g/L.

Во чекорот на миеше на примарното антитело утврдено дека 0,1% раствор на Tween 20 во 0,1% BSA/PBS оптимално ја намалува позадинската абсорпција.

Определување на cut-off вредности

Со ROC анализата определени се cut-off вредностите за позитивна IgG и IgM анти-GM1 реактивност. Како негативни, користени се резултатите од d-OD од HC а како позитивни резултатите од d-OD за IgM и IgG добиени од пациенти со MMN и GBS, соодветно (Слика 1). ROC анализата укажа на специфичност од 100% за IgM и 100% за IgG со осетливост од 46% и 21%, соодветно. Површината под ROC кривата изнесува 0,78 за IgM и 0,67 за IgG.



Слика 1. ROC криви за анти-GM1 реактивност

Оптималната cut-off вредност добиена од ROC анализата е 0,3 за IgM и 0,2 за IgG. Пониски вредности ја зголемуваат осетливоста но резултираат со повисока грешно позитивна фракција. За овој тест

се препорачува помала грешно позитивна фракција за сметка на повисока сензитивност.

ЗАКЛУЧОК

Оптимизиран е ELISA метод за определување на серумски анти-GM1 антитела кој може да се користи во дијагноза на имунопосредувани периферни невропатии.

РЕФЕРЕНЦИ

- [1] Adams D, Kuntzer T, Burger D, Choffon M, Magistris MR, Regli F, Steck AJ J Neuroimmunol 1991; 32:223-230
- [2] Sadiq SA, Thomas FP, Kilidireas K, Protosaltis S, Hays AP, Lee KW, et al. Neurology 1990;40:1067-72.
- [3] Berg LH, Marrink AEJ, Jong HJ, Imhoff GW, Latov N, Sadiq SA. J Neurol Neurosurg Psych 1992;55:8-11.
- [4] Willison HJ, Yuki N. Brain 2002;125:2591- 625.
- [5] Feldman EL, Bromberg MB, Alberes JW, Pestronk A. Ann Neurol 1991;30:397-401.
- [6] Alaedini A, Latov N. J Clin Lab Anal 2001;15:96-9
- [7] Conrad K, Schneider H, Ziemsen T, Talaska T, Reinhold D, Humbel RL, Roggenbuck D. Ann NY Acad Sci, 1109: 256-64
- [8] Ravindranath MH, Ravindranath RM, Morton DL, Graves MC 1994, J Immunol Methods. 1994; 169: 257-72
- [9] Kuijff M, van Doorn P, Tio-Gillen A, Geleijns K, Ang W Hooijkaas H, Hop W.Jacobs. 2005; J Neurol Sci, 239; 37 - 44
- [10] Bech E, Jakobsen J, Orntoft T, Clin Chem 1994: 40/7, 1331-4

CHARACTERIZATION OF GLYCOPROTEINS ISOLATED FROM HUMAN PERIPHERAL NERVE AND TWO *CAMPYLOBACTER JEJUNI* O:19 ISOLATES: ENTERITIS AND GBS ASSOCIATED

K. Brezovska¹, A. Poceva Panovska¹, A. Grozdanova¹, S. Apostolski², Lj. Suturkova¹

¹ Faculty of Pharmacy, University Ss. Cyril and Methodius, Skopje, Macedonia

² Outpatient Neurological Clinic, Belgrade, Serbia

INTRODUCTION

Antibodies that cross-react with lipopolysaccharide (LPS) from *Campylobacter jejuni* (*C.jejuni*) and with different gangliosides from peripheral nerves are detected in sera from patients with Guillain-Barré (GBS) following infection with *C.jejuni* [1]. The response to bacterial and neural glycolipids is significantly lower in patients with uncomplicated *C.jejuni* enteritis, despite the presence of ganglioside mimics in the LPS of some enteritis isolates. These findings underscore the influence of other host related factors in addition to bacterium related factors, in the development of neurological symptoms after an infection with *C.jejuni* [2]. Sera from patients with GBS following infection with *C.jejuni*, showed positive reactivity to a 63 kDa flagellar protein purified from *C.jejuni* (O:19) and with Gal (b1-3) GalNAc - bearing glycoproteins isolated from peripheral nerve [3,4]. These data indicate on possible molecular mimicry of glycoproteins present in *C.jejuni* and Gal (b1-3) GalNAc - bearing glycoproteins present in human peripheral nerve and its potential role in the development of neuropathies.

The aim of our study was to characterize the glycoproteins present in human peripheral nerve and in *C.jejuni* (O:19) isolated from patient with uncomplicated enteritis and *C.jejuni* (O:19) isolated from patient

with enteritis followed by GBS. For that purpose we tested the reactivity of total protein extracts from human peripheral nerve and from two bacterial isolates with peanut agglutinin (PNA) as a marker for the Gal (b13) GalNAc determinant and with sera from patients with GBS.

EXPERIMENTAL

Isolation of glycoproteins from human peripheral nerve

Human peripheral nerve was obtained at postmortem within 8 hr after death from patients who died from non-neurological disease and was kept frozen at -70 °C (Department of forensic medicine, Faculty of Medicine, University Ss. Cyril and Methodius, Skopje, Macedonia). Isolation of glycoproteins from human peripheral nerve was done according to Apostolski et al., 1994 [4]. Obtained isolate was stored at 20°C, until use.

Isolation of proteins from *C. jejuni* serotype O:19 (GBS and enteritis associated)

C. jejuni serotype O:19, GBS associated, was obtained from ATCC 700297. *C. jejuni* serotype O:19, enteritis associated, was obtained from the Institute for Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Skopje. Cultures were grown at 37° in Campylobacter agar, 48 h under microaerophilic conditions. Proteins were extracted from the bacterial cells using the method described by Liu X, et al., 2006 [5].

Determination of protein concentration

The protein concentration (mg/ml) in the isolates were determined using Bradford microassay procedure, using the calibration curve (absorbance relative to the concentration) obtained from standard solutions of bovine serum albumin (BSA) in concentration range 0.2 - 3 mg/ml [6].

Western blot analysis of isolated glycoproteins

Isolated glycoproteins (10 mg/well) were separated on 10 % acrylamid/bisacrylamid gel, using sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis according to the method of Laemmli 1970 [7]. After electrophoresis proteins were transferred onto nitrocellulose sheets and analyzed on western blot by incubating with biotinylated PNA (10 mg/ml) and sera from 6 patients with GBS (1:100).

RESULTS AND DISCUSSION

The concentrations of isolated glycoproteins from human peripheral nerve and from *C. jejuni* (O:19), enteritis associated and GBS associated, determined by the method of Bradford are given in Table 1.

Protein isolates from:	Concentration (µg/µl)
Human peripheral nerve	1.8 µg/µl
<i>C. jejuni</i> O:19 enteritis	1.6 µg/µl
<i>C. jejuni</i> O:19 GBS	0.5 µg/µl

Table 1. Concentration of the protein isolates

PNA staining of the separated glycoproteins isolated from human peripheral nerve and *C. jejuni* (O:19) indicate on the presence of the GalGalNAc determinant in several proteins (Fig 1).

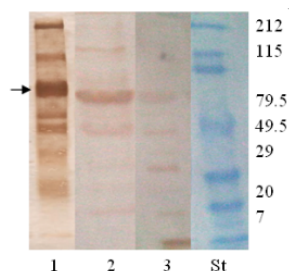


Fig 1. Western blot of isolated glycoproteins from: human peripheral

nerve (Lane 1), *C. jejuni* GBS associated (Lane 2), *C. jejuni* enteritis associated (Lane 3) stained with biotinylated PNA.

Western blot analysis of the reactivity of isolated proteins to sera from patients with GBS, revealed positive reactivity of one main protein band with mobility of approximately 60 kDa, present in all three protein extracts (Fig 2). Figure 2 also shows positive reactivity of bands with molecular weight lower than 60 kDa. The reactive bands were more intense in lanes with isolate from *C. jejuni* (O:19) GBS associated.

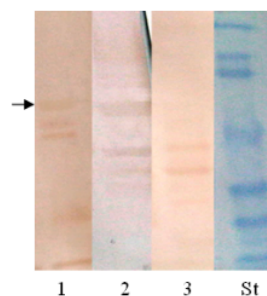


Fig 2. Western blot of isolated glycoproteins from: human peripheral nerve (Lane 1), *C. jejuni* GBS associated (Lane 2) and *C. jejuni* enteritis associated (Lane 3) incubated with GBS sera.

CONCLUSION

The presence of the GalGalNAc determinant was confirmed in several glycoproteins present in protein extracts from human peripheral nerve and from two bacterial isolates: *C. jejuni* O:19 enteritis associated and GBS associated. These glycoproteins showed cross-reactivity to sera from patients with GBS, which supports the hypothesis of molecular mimicry between human and bacterial glycoprotein structures. Further studies are needed for elucidation of the molecular structure of the cross-reactive glycoproteins and their potential role in pathogenesis of autoimmune neuropathies.

REFERENCES

- Wirguin I, Suturkova-Milosevic Lj, Della-Latta P, Fisher T, Brown RH Jr, Latov N (1994), *Ann. Neurol.*, 35: 698-703
- Ang CW, Laman JD, Willison HJ, Wagner ER, Endtz HP, De Klerk MA, Tio-Gillen AP, Van den Braak N, Jacobs BC, Van Doorn PA (2002), *Infect. Immun.*, 70: 1202-1208
- Lange D, Aleksic S, Kassubek J, Vrvic MM, Kist M, Steinbruckner B, Mitova M (1999), *Zent. Bl. Bakteri.*, 289: 429-444
- Apostolski S, Sadiq SA, Hays A, Corbo M, Suturkova-Milosevic Lj, Chaliff P, Stefansson K, LeBaron RG, Ruoslahti E, Hays AP, Latov N. (1994) *J Neurosci Res*; 38:134-141
- Liu X, McNally DJ, Nothaft H, Szymanski CM, Brisson JR, Li J. (2006) *Anal. Chem.*; 78: 6081-6087.
- Bradford M.M. (1976) *Anal. Biochem.*, 72, 148-254
- Laemmli (1970) U.K. *Nature*, 227: 680-685

КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НА ГЛИКОПРОТЕИНИ ИЗОЛИРАНИ ОД ХУМАН ПЕРИФЕРЕН НЕРВ И ОД ДВА ИЗОЛАТИ НА *SAMPYLOBACTER JEJUNI* (O:19): ЕНТЕРИТИС И GBS АСОЦИРАНИ

К.Брезовска¹, А.Поцева Пановска¹, А.Грозданова¹, С.Апостолски², Љ.Шутуркова¹

¹ Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, Р. Македонија

² Ординација за неврологија “Др. Апостолски”, Белград, Србија

ВОВЕД

Во серуми од пациенти со Guillain-Barré синдром (GBS), настанат по инфекција со *Campylobacter jejuni* (*C.jejuni*), се детектирани антителиа кои вкрстено реагираат со липополисахаридот (ЛПС) од *C.jejuni* и со различни ганглиозиди од периферните нерви [1]. Имунолошкиот одговор кон бактериските и невралните гликолипиди е значително понизок кај пациенти со некомплицирани инфекција со *C.jejuni* и покрај присуството на ганглиозидна мимикрија во изолираниот ЛПС. Ова укажува на влијание на други фактори (од домаќинот или бактеријата) во развојот на невролошките симптоми по инфекција со *C.jejuni* [2].

Серуми од пациенти со GBS настанат по инфекција со *C.jejuni*, покажуваат позитивна реактивност со флагеларен протеин (63 kDa) изолиран од *C.jejuni* серотип O:19 и со Gal(b1-3)GalNAc-врзувачки гликопротеини изолирани од хуман периферен нерв [3,4]. Овие податоци укажуваат на можноста за постоење на молекуларна мимикрија на гликопротеини присутни во *C.jejuni* и гликопротеини присутни во хуманите периферни нерви и на нејзината потенцијална улога во развојот на невропатиите.

Целта на овој труд беше да се карактеризираат гликопротеините присутни во хуман периферен нерв и во *C.jejuni* (O:19), изолиран од пациенти со некомплицирани ентеритис и од пациенти со ентеритис пропратен со GBS. За таа цел беше испитана реактивноста на вкупните протеински екстракти од хуман периферен нерв и од двата бактериски изолати со аглутинин од кикирики (peanut agglutinin - PNA) како маркер за Gal (b1-3) GalNAc детерминантата и со серуми од пациенти со GBS.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ

Изолација на протеини од хуман периферен нерв

Хуманиот периферен нерв е добиен постмортално, 8 часа по смрт на пациент кој починал од не-невролошка болест и се чува замрзнат на -70 °C. (Институт за судска медицина, Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, Р. Македонија). Изолацијата на гликопротеините беше извршена според прописот на Apostolski et al., 1994 [4]. Добиените изолати се чувани на -20°C, до употреба.

Изолација на протеини од *C.jejuni* серотип O:19 (GBS и ентеритис асоциран)

C.jejuni серотип O:19, GBS асоциран, е добиен од ATCC 700297. *C.jejuni* серотип O:19, ентеритис асоциран, е добиен од Институтот за микробиологија и паразитологија, Медицински факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, Р. Македонија. Културите се растени на 37° во *Campylobacter* агар, 48 часа во микроаерофилни услови. Протеините се екстрахирани од бактериските клетки со примена на методот опишан од Liu X, et al., 2006 [5].

Одредување на концентрација на изолираните протеини

Концентрацијата на протеините (mg/ml) е определена со примена на методот на Bradford [6]. Калибрационата крива (абсорбација/концентрација) е добиена од стандардни раствори на говедски серум албумин (BSA) во опсег од 0,2 - 3 mg/ml.

Western blot анализа

Изолираните гликопротеини по сепарација на SDS/PAGE електрофореза (10% acrylamid/bisacrylamid гел) [7] (10 mg/бунарче,) и трансфер на нитроцелулозна мембрана, се анализирани на western blot со инкубација со биотинилиран PNA (10 mg/ml) и серуми од 6 пациенти со GBS (1:100).

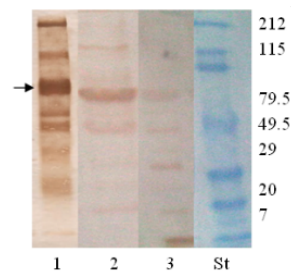
РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Концентрациите на протеините во изолатите од хуман периферен нерв и од бактериите, определени со методот на Bradford, се дадени во Табела 1.

Протеински изолати од:	Концентрација (µg/µl)
Хуман периферен нерв	1,8 µg/µl
<i>C.jejuni</i> O:19 ентеритис	1,6 µg/µl
<i>C.jejuni</i> O:19 GBS	0,5 µg/µl

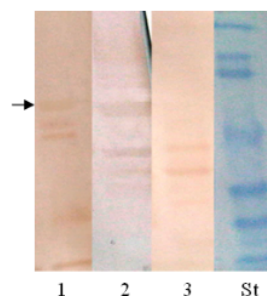
Табела 1. Концентрација на изолираните протеини

Протеински изолати од: Концентрација (µg/µl) Хуман периферен нерв 1,8 µg/µl *C.jejuni* O:19 ентеритис 1,6 µg/µl *C.jejuni* O:19 GBS 0,5 µg/µl Боенето на сепарираниите гликопротеини со PNA укажува на присуство на GalGalNAc детерминантата во неколку протеини во сите три екстракти (Слика 1).



Слика 1. Western blot анализа на гликопротеини од хуман периферен нерв (1), *C.jejuni* GBS асоциран (2) and *C.jejuni* ентеритис асоциран (3) боени со биотинилиран PNA.

Western blot анализата на реактивноста на изолираните гликопротеини со серуми од пациенти со GBS, покажа позитивна реактивност на еден главен протеин со молекулска маса околу 60 kDa, и неколку други протеини со помала молекулска маса, во сите три протеински екстракти (Слика 2). Реактивноста е поинтензивна во изолатот од *C.jejuni* (O:19) GBS асоциран, во однос на изолатот од *C.jejuni* (O:19) ентеритис асоциран.



Слика 2. Western blot анализа на гликопротеини од хуман периферен нерв (1), *C.jejuni* GBS асоциран (2) and *C.jejuni* ентеритис асоциран (3) инкубирани со серум од GBS.

ЗАКЛУЧОК

Во протеинските екстракти добиени од хуман периферен нерв и од двата изолати на *C. jejuni* (O:19): ентеритис и GBS асоцирани, потврдено е присуството на GalGalNAc детерминантата кај неколку протеини и истите вкрстено реагираат со серуми од пациенти со GBS. Оваа вкрстена реактивност ја поддржува хипотезата за молекуларна мимикрија помеѓу хуманите и бактериските протеински структури.

Потребни се понатамошни испитувања за расветлување на молекуларната структура на вкрстено-реактивните гликопротеини и нивната потенцијална улога во автоимуните невропатии.

ЛИТЕРАТУРА

- Wirguin I, Suturkova-Milosevic Lj, Della-Latta P, Fisher T, Brown RH Jr, Latov N (1994), *Ann. Neurol.*, 35: 698-703
- Ang CW, Laman JD, Willison HJ, Wagner ER, Endtz HP, De Klerk MA, Tio-Gillen AP, Van den Braak N, Jacobs BC, Van Doorn PA (2002), *Infect. Immun.*, 70: 1202-1208
- Lange D, Aleksic S, Kassubek J, Vrvic MM, Kist M, Steinbruckner B, Mitova M (1999), *Zent. Bl. Bakteriол.*, 289: 429-444
- Apostolski S, Sadiq SA, Hays A, Corbo M, Suturkova-Milosevic Lj, Chaliff P, Stefansson K, LeBaron RG, Ruoslahti E, Hays AP, Latov N. (1994) *J Neurosci Res*; 38:134-141
- Liu X, McNally DJ, Nothaft H, Szymanski CM, Brisson JR, Li J. (2006) *Anal. Chem.*; 78: 6081-6087.
- Bradford M.M. (1976) *Anal. Biochem.*, 72, 148-254
- Laemmli (1970) *U.K. Nature*, 227: 680-685

INDUCTION OF ANTI-GANGLIOSIDE ANTIBODIES IN GUILLAIN-BARRE SYNDROME ANIMAL MODEL

Grozdanova Aleksandra¹, Poceva Panovska Ana¹, Brezovska Katerina¹, Trajkovska-Dokić Elena², Apostolski Slobodan³, Suturkova Ljubica¹

¹ Institute for Pharmaceutical chemistry, Faculty of Pharmacy, "St Cyril and Methodius" University, Skopje

² Institute of Microbiology and parasitology, Medical faculty, "St Cyril and Methodius" University Skopje

³ Outpatient Neurological Clinic, Belgrade, Serbia

INTRODUCTION

Experimental evidence obtained from human and animal studies support the hypothesis that carbohydrate mimicry between lipopolysaccharides (LPSs) from certain *Campylobacter jejuni* serotypes and human neural gangliosides can result in production of antiganglioside antibodies which play a key role in pathogenesis Guillain-Barre syndrome (GBS).

Latest data showed that one third of GBS patients had conferred antecedent *C. jejuni* infection, and that specific *C. jejuni* serotypes are associated with development of GBS. *C. jejuni* serotype O:19 is most commonly associated with GBS, and reports showed association also with O:2, O:15, O:18, O:24, O:30, O:37 and O:53 serotypes. Animal models used to reproduce GBS can be achieved by infection or by immunization with the infection agent or purified antigens in order to induce cross-reactive immune response, clinical symptoms or to investigate other aspects of proposed molecular mimicry.

AIM

The aim of the present study was to investigate whether immunization of rabbits with LPSs of different *C. jejuni* serotypes isolated from uncomplicated enteritis patients can induce anti-ganglioside and anti-LPS antibodies. The development of pathophysiological features in immunized animals was investigated.

MATERIAL AND METHODS

New Zealand white rabbits were immunized with LPSs *C. jejuni* serotypes O:3, O:19, O:27, O:37 isolated from enteritis patients and with *C. jejuni* LPS O:19 (ATCC 700297) reference strain from GBS patient. In the structure of LPSs used for immunization we conferred the presence of cross-reactive ganglioside-like epitopes through binding studies with cholera toxin B subunit and peanut agglutinin, with exception of serotype O:3 known not to contain a ganglioside like structure and which was used as control. We used complete Freund's adjuvant (CFA) and keyhole-limpet hemocyanine (KLH) as adjuvants.

RESULTS

The animals were tested every 2 weeks in period of 6 months for IgG and IgM anti-ganglioside (GM1 and AG1) and anti-LPS antibodies using ELISA. The stool cultures for *C. jejuni* were all negative, indicating that the rise in antibodies had been induced by the immunization and not by a concurrent infection with *C. jejuni*. Furthermore, antiganglioside and anti-LPS reactivity could not be detected in preimmune serum samples. Neither anti-LPS nor anti-ganglioside response was seen in the adjuvant controls. In general all rabbits immunized with LPSs responded with the production of IgM and IgG anti-LPS antibodies that could be detected a few weeks before anti-ganglioside responses. Elevated titers of IgM antibodies to LPS could be detected 14 days after the first injection while IgG responses to LPS were present after 28 days and continued to rise during the immunization period.

Rabbits that were immunized with LPS O:19 GBS associated serostrain (ATCC 700297) had highest IgM and IgG anti-GM1 antibodies, and high anti-GA1 IgG. Strong IgG and IgM GM1 antibody response was detected in animals immunized with LPS O:19 enteritis isolate, with modes induction of IgG anti-GA1. Serotypes O:27 and O:37 from enteritis patients induce rise in the IgG anti-GA1 antibody, but low level of anti-GM1 antibody were detected.

Immunization with LPS from the O:3 serostrain, which does not bear ganglioside structure, only resulted in a strong anti-LPS response, with no reactivity against any of the gangliosides.

CONCLUSIONS

The animals did not develop any neurological signs during the 6-month follow-up period, but loss of weight, partial weakness and absence of reactivity were present in animal. The sera from immunized animal with high GM1 and AG1 antibody reacted with isolated LPSs structures from *C. jejuni* enteritis patients, indicating that carbohydrate mimicry between gangliosides and the *C. jejuni* LPS induces the production of cross-reactive autoantibodies and probably triggers the development of GBS.

REFERENCES

- Ang C.W., De Klerk M. A., Endtz H. P., Jacobs B.C., Laman J. D., Van der Meche F.G.A. and Van Doorn P.A., 2001. Guillain-Barre syndrome and Miller-Fisher syndrome-associated *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides induce anti-GM1 and anti-GQ1b antibodies in rabbits. *Infect. Immun.* 69: 2462-2469
- Ang C.W., Jacobs B.C., Laman J.D., 2004. The Guillain-Barre syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends Immunol.* 25:61-66.
- Ariga T. and Yu R. K., 2005. Anti-glycolipid antibodies in Guillain-Barre syndrome and related diseases: review of clinical features and antibody specificities. *J. Neurosci. Res.* 80:1-17.

- Aspinal G.O., McDonald A.G., Raju T.S., Pang H., Moran A.P. and Penner J.L., 1993. Chemical structures of the core regions of *Campylobacter jejuni* serotypes O:1, O:4, O:23, and O:36 lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 213:1017-1027.
- Grozdanova A., Poceva A., Brezovska K., Trajkovska-Dokic E., Apostolski S. and Suturkova Lj., 2011. Cross-reactive epitopes in *Campylobacter jejuni* strains isolated from enteritis patients, *Prilozi MASA*, June 2011 (in press)
- Hughes R.A. 1999. Pathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *J. Neuroimmunol.* 100, 74-97
- Hughes R.A. 2005. Multidisciplinary Consensus Group. Supportive care for patients with Guillain-Barré syndrome. *Arch. Neurol.* 62: 1194-1198.
- Hughes R.A., Swan A. V., Raphael J., Annane D. and Van Doorn P.A. 2007. Immunotherapy for Guillain-Barré syndrome: a systematic review *Brain*, vol. 130, 2245-2257
- Illa I., Ortiz N., Gallard E., Juarez C., Grau J.M. and Dalakas M.C. 1995. Acute axonal Guillain-Barré syndrome with IgG antibodies against motor axons following parenteral gangliosides. *Ann Neurol*, 38:218-24.
- Ilyas A.A., Willison H.J., Quarles R.H., Jungalwala F.B., Cornblath D.R., Trapp B.D., Griffin D.E., Griffin J.W. and Mckhann G.M. 1988. Serum antibodies to gangliosides in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 23:440-447
- Nachamkin I. 2001. *Campylobacter* Enteritis and the Guillain-Barré Syndrome. *Curr Infect Dis Rep* 3, 116-122.
- Plomp J.J. et al. 1999. Miller Fisher anti-GQ1b antibodies: a-latrotoxin-like effects on motor endplates. *Ann. Neurol.* 45, 189-199
- Rees J.H., Soudain S.E., Gregson N.A. and Hughes R. A.C., 1995., *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barré syndrome, *The New England Journal of Medicine*, vol. 333, no. 21, 1374-1379
- Rose N.R. and Mackay, I.R. 2000. Molecular mimicry: a critical look at exemplary instances in human diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 542-551
- Sheikh K. A., I. Nachamkin, T. W. Ho, H. J. Willison, J. Veitch, H. Ung, M. Nicholson, C. Y. Li, H. S. Wu, B. O. Shen, D. R. Cornblath, A. K. Asbury, G. M. Mckhann, and J. W. Griffin. 1998. *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides in Guillain-Barré syndrome: molecular mimicry and host susceptibility. *Neurology* 51:371-378.
- Van Doorn P.A 2008. Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barré syndrome, *The Lancet Neurology*, vol. 7, no. 10, 939-950
- Wirguin I., Briani C., Suturkova-Milosevic L., Fisher T., Della-Latta P., Chalif P., and Latov N., 1997. Induction of anti-GM1 ganglioside antibodies by *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides. *J. Neuroimmunol.* 78:138-142.
- Yuki N., Yamada M., M. Koga, 2001. Animal model of axonal Guillain-Barré syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside, *Annals of Neurology*, vol. 49, no. 6, pp. 712-720
- Yuki N., K. Susuki, M. Koga, Y. Nishimoto, M. Odaka, K. Hirata, K. Taguchi, T. Miyatake, K. Furukawa, T. Kobata, and M. Yamada. 2004. Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barré syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:11404-11409.

СОЗДАВАЊЕ НА АНТИ-ГАНГЛИОЗИДНИ АНТИТЕЛА ВО ЖИВОТИНСКИ МОДЕЛ НА GUILLAIN-BARRÉ СИНДРОМОТ

Грозданова Александра¹, Поцева-Пановска Ана¹,
Брезовска Катерина¹, Трајковска-Докиќ Елена²,
Апостолски Слободан³, Шутуркова Љубица¹

¹Институт за Фармацевтска хемија, Фармацевтски факултет, Ун. "Св. Кирил и Методиј", Скопје, Македонија

²Институт за Миробологија и паразитологија, Медицински факултет, Ун. "Св. Кирил и Методиј", Скопје, Македонија

³Ординација за неврологија "Др. Апостолски", Белград, Србија

ВОВЕД

Експерименталните докази добиени од хумани и животински иштувања ја потврдуваат хипотезата дека јаглехидратната мимикрија помеѓу липополисахаридите (LPS) од одредени *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) серотипови и хуманите невронски ганглиозиди може да резултираат со создавање на антиганглиозидни антитела кои играат главна улога во патогенезата на Guillain-Barré синдромот (GBS).

Поновите податоци покажуваат дека една третина од пациентите со GBS имаат потврдена предходна инфекција со *C. jejuni*, и дека специфични серотипови на *C. jejuni* се асоцирани со развивање на GBS. *C. jejuni* серотипот O:19 е најчесто асоциран со GBS, а постојат податоци за асоцираност и со O:2, O:15, O:18, O:24, O:30, O:37 и O:53 серотиповите. Животинските модели кои се користат за да се репродуцира GBS може да се добијат преку инфекција или имунизација со инфективен агенс или прочистен антиген со цел да се поттикне вкрстено-реактивен имун одговор, клинички симптоми или да се испитуваат други аспекти на предложената молекуларна мимикрија.

ЦЕЛ

Целта на оваа студија е да се испита дали имунизацијата на зајци со ЛПС од различни *C. jejuni* серотипови изолирани од некомплицирани пациенти со ентеритис, ќе доведе до создавање на антиганглиозидни и анти-ЛПС антитела. Беше следен и развојот на патофизиолошките карактеристики во имунизираните животни.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Бели зајци од сојот New Zealand беа имунизирани со LPS од *C. jejuni* серотиповите O:3, O:19, O:27, O:37 изолирани од пациенти со ентеритис и со *C. jejuni* LPS O:19 (ATCC 700297) референтниот сој од пациент со GBS. Во структурата на LPSs користени за имунизација беше потврдено присуството на вкрстено-реактивни ганглиозид слични епитопи, преку студии со врзување со колера токсин Б суб-единица и лектин од кикирика. Кај серотипот O:3 отсуствува ганглиозид слична структура и овој серотип беше користен како негативна контрола. Беа користени комплетен Freund адјуванс (CFA) и кејхол-лифет хемоцијанид (KLH) како адјуванси.

РЕЗУЛТАТИ

Имунизираните животни беа тестирани секои 2 недели во период од 6 месеци за присуство на IgG и IgM анти-ганглиозидни (GM1 и AG1) и анти-LPS антитела со употреба на ЕЛИСА. Феџесот на сите имунизирани животни беше негативен, упатувајќи дека покачувањето на антителата е индуцирано од имунизацијата а не од истовремена инфекцијата со *C. jejuni*. Дополнително, анти-ганглиозидните и анти-LPS антитела не беа присутни во серумот на животните пред имунизација. Кај контролната група на животни имунизирана со адјуванси не се јави ниту анти-LPS ниту анти-ганглиозиден одговор. Генерално кај сите зајци имунизирани со LPS дојде до создавање на IgM и IgG анти-LPS антитела кои можеа да се детектираат неколку недели пред анти-ганглиозидниот одговор. Зголемено ниво на IgM антитела кон LPS може да се детектираат 14 дена по првата инјекција со LPS додека IgG одговорот кон LPS беше присутен после 28 дена и продолжи да покачува во тек на имунизациониот период. Зајците имунизирани со LPS O:19 GBS асоцираниот серотип (ATCC 700297) имаа највисок IgM и IgG анти-GM1 антитела, и висок анти-GA1 IgG. Силен IgG и IgM GM1 антителен одговор се јави кај животните имунизирани со LPS O:19 изолатот од ентеритис пациент, со благо покачување на IgG анти-GA1. Серотиповите O:27 и O:37 од ентеритис пациентите индуцираат покачување на IgG анти-GA1 антитела, но ниско ниво на анти-GM1 антитела беше определено. Имунизацијата со LPS серотип O:3 кој не содржи ганглиозидна структура, резултираше само со силен анти-LPS одговор, без реактивност кон ганглиозидите.

ЗАКЛУЧОЦИ

Животните не развија било какви невролошки симптоми во тек на 6 месеци на следење, но беше забележано губење на тежина, парцијална слабост и отсуство на реактивност кај животните. Серумот од имунизирани животни со висок титар на GM1 и AG1 антитела реагираше со LPSs од *C. jejuni* изолирани од пациенти со ентеритис, упатувајќи дека јагледхидратната мимикрија меѓу ганглиозидите и *C. jejuni* LPS индуцира создавање на вкрстено реактивни авто антитела кои најверојатно иницираат развивање на GBS.

ЛИТЕРАТУРА

- Ang C.W., De Klerk M. A., Endtz H. P., Jacobs B.C., Laman J. D., Van der Meche F.G.A. and Van Doorn P.A., 2001. Guillain-Barre syndrome and Miller-Fisher syndrome-associated *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides induce anti-GM1 and anti-GQ1b antibodies in rabbits. *Infect. Immun.* 69: 2462-2469
- Ang C.W., Jacobs B.C., Laman J.D., 2004. The Guillain-Barre syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends Immunol.* 25:61-66.
- Ariga T. and Yu R. K., 2005. Anti-glycolipid antibodies in Guillain-Barre syndrome and related diseases: review of clinical features and antibody specificities. *J. Neurosci. Res.* 80:1-17.
- Aspinall G.O., McDonald A.G., Raju T.S., Pang H., Moran A.P. and Penner J.L., 1993. Chemical structures of the core regions of *Campylobacter jejuni* serotypes O:1, O:4, O:23, and O:36 lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 213:1017-1027.
- Grozdanova A., Poceva A., Brezovska K., Trajkovska-Dokic E., Apostolski S. and Suturkova Lj., 2011. Cross-reactive epitopes in *Campylobacter jejuni* strains isolated from enteritis patients, *Prilozi MASA*, June 2011 (in press)
- Hughes R.A. 1999. Pathogenesis of Guillain-Barre' syndrome. *J. Neuroimmunol.* 100, 74-97
- Hughes R.A. 2005. Multidisciplinary Consensus Group. Supportive care for patients with Guillain-Barre syndrome. *Arch., Neurol.* 62: 1194-1198.
- Hughes R.A., Swan A. V., Raphael J., Annane D. and Van Doorn P.A. 2007. Immunotherapy for Guillain-Barre syndrome: a systematic review *Brain*, vol. 130, 2245-2257
- Illa I., Ortiz N., Gallard E., Juarez C., Grau J.M. and Dalakas M.C. 1995. Acute axonal Guillain-Barre syndrome with IgG antibodies against motor axons following parenteral gangliosides. *Ann Neurol*, 38:218-24.
- Ilyas A.A., Willison H.J., Quarles R.H., Jungalwala F.B., Cornblath D.R., Trapp B.D., Griffin D.E., Griffin J.W. and Mckhann G.M. 1988. Serum antibodies to gangliosides in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 23:440-447
- Nachamkin I. 2001. *Campylobacter* Enteritis and the Guillain-Barre Syndrome. *Curr Infect Dis Rep* 3, 116-122.
- Plomp J.J. et al. 1999. Miller Fisher anti-GQ1b antibodies: a-latrotoxin-like effects on motor endplates. *Ann. Neurol.* 45, 189-199
- Rees J.H., Soudain S.E., Gregson N.A. and Hughes R. A.C., 1995., *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barre syndrome, *The New England Journal of Medicine*, vol. 333, no. 21, 1374-1379
- Rose N.R. and Mackay, I.R. 2000. Molecular mimicry: a critical look at exemplary instances in human diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 542-551
- Sheikh K. A., I. Nachamkin, T. W. Ho, H. J. Willison, J. Veitch, H. Ung, M. Nicholson, C. Y. Li, H. S. Wu, B. O. Shen, D. R. Cornblath, A. K. Asbury, G. M. Mckhann, and J. W. Griffin. 1998. *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides in Guillain-Barre syndrome: molecular mimicry and host susceptibility. *Neurology* 51:371-378.
- Van Doorn P.A. 2008. Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barre syndrome, *The Lancet Neurology*, vol. 7, no. 10, 939-950
- Wirguin I., Briani C., Suturkova-Milosevic L., Fisher T., Della-Latta P., Chalif P., and Latov N., 1997. Induction of anti-GM1 ganglioside antibodies by *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides. *J. Neuroimmunol.* 78:138-142.
- Yuki N., Yamada M., M. Koga, 2001. Animal model of axonal Guillain-Barre syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside, *Annals of Neurology*, vol. 49, no. 6, pp. 712-720
- Yuki N., K. Susuki, M. Koga, Y. Nishimoto, M. Odaka, K. Hirata, K. Taguchi, T. Miyatake, K. Furukawa, T. Kobata, and M. Yamada. 2004. Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipopoligosaccharide causes Guillain-Barre syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:11404-11409.

INDIVIDUALIZED EPILEPSY TREATMENT WITH CARBAMAZEPINE AND VALPROIC ACID

Sterjev.Z, Dimovski.iAJ, Suturkova.Lj

University "St.Cyril and Methodius" Faculty of Pharmacy Skopje, Republic of Macedonia

Epilepsy is a serious chronic neurological disorder, affecting an estimated 42 million people worldwide or 5% from the world population. About 15 different antiepileptic drugs (AEDs) are currently available, exhibiting widely varying mechanisms of action. Drug-resistant epilepsy is defined as the persistence of seizures despite treatment with a range of AEDs, using different mechanisms of action singly or in combination at maximum tolerated doses. The mechanisms underlying the development of drug resistance in epilepsy is a mix of pharmacokinetic, pharmacodynamic and pharmacogenetic factors. Predictors associated with treatment-resistant epilepsy are different and include: interindividual differences among patients in the absorption and metabolizing of AED, variability in drug-receptor interactions, quantity of target receptor etc. The genetic constitution of individuals exists as a background of individual response to AED and influence almost all phases of drug transformation. Carbamazepine and Valproic acid have been subjects of a lot of pharmacogenetics studies. Association investigation have been undertaken for genes implicated in drug transport (*MDR1/ABC1*), end-organ drug targets (sodium channel *SCN1A*) and drug metabolizing enzymes (*CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP1A2*, *UGT2B7* and *EPHX1*). The aim of the present article is to reviews the published data on the influence of pharmacogenetics on drug treatment of epilepsy and to present the results from R.Macedonia in this area. For this article, we reviewed the English literature listed on PubMed published during the last 20 years using the following keywords: antiepileptic drugs, pharmacogenetics of antiepileptic drugs, pharmacoresistant epilepsy, single nucleotide polymorphism and antiepileptic drugs. We will also present our data on the influence of several variants on the efficacy of carbamazepine [*SCN1A* IVS5N + 5 G>A; *ABC1* 3435C>T; *EPHX1c* (416 A>G); *EPHX1c* (337 T>C)] and valproic acid [*UGT1A6**2,c.541A>G, *CYP2C9**2 (430 C>T), *CYP2C9**3 (1075A>C), *CYP2C19**3, 636G>A, *CYP2C19**2, 681G>A) for VPA] obtained in the past several years on patients treated at the Clinic for Neurology, Faculty of Medicine, Skopje.

REFERENCES

- Löscher W et al. The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. *Epilepsia* 2009 Jan;50(1):1-23. Epub 2008 Jul 8.
- Szoeke CE et al. Update on pharmacogenetics in epilepsy: a brief review. *Lancet Neurol.* 2006 Feb;5(2):189-96.
- Tate SK et al. Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of antiepileptic drugs carbamazepine and phenytoin. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 2005Apr 12;102(15);5507-12.
- Tan L et al. The influence of cytochrome oxidase *CYP2A6*, *CYP2B6*, and *CYP2C9* polymorphisms on the plasma concentrations of valproic acid in epileptic patients. *Clin Neurol Neurosurg.* 2010 May;112(4):320-3. Epub 2010 Jan 20.

ИНДИВИДУАЛИЗАЦИЈА НА ТЕРАПИЈА СО CARBAMAZEPINE И VALPROIC ACID

Стерјев.З, Димовски А.Ј., Шутуркова. Л

Фармацевтски факултет - Скопје, Универзитет Св. Кирил и
Методиј-Скопје, Р.Македонија

Епилексијата претставува сериозно хронично невролошко заболување од кое што во светот боледуваат околу 42 милиони луѓе или околу 5% од целокупната светска популација. За третман на ова заболување денес се користат околу 15 антиепилептични лекови (АЕЛ) кои припаѓаат на различни хемиски групи. Неуспехот од постигнувањето на позитивен терапевтски одговор при третман на епилексијата (фармакорезистентна епилексија) се објаснува како склоп на повеќе фактори поврзани со фармакокинетските, фармакодинамските и фармакогенетските особини на антиепилептичните лекови кои влијаат на резултатот од терапијата. Причините за различниот одговор на антиепилептичната терапија се различни и во себе вклучуваат: индивидуални разлики помеѓу пациентите во процесот на апсорпција, метаболизам на АЕЛ, варијабилности во врзувањето на АЕЛ за рецепторните места, варијации во количеството на АЕЛ рецептори продуцирани кај различни индивидуи и др. Како позадина на сите овие разлики помеѓу индивидуите стои различниот генетски профил на секој поединец. Се смета дека постои т.н генетска контрола во секоја фаза низ која поминува лекот, од апсорпцијата па се до елиминација од организмот. До денес, вршени се испитувања на потенцијално одговорни гени кои кодираат процеси кои се директно поврзани со терапевтскиот одговор на лековите Carbamazepine и Valproic acid и тоа: гените вклучени во транспортот на лековите (MDR1/ABCB1), крајните орган-лек рецептори (SCN1A) и гени вклучени во метаболните процеси (PXR, OCT2N, CYP2D6, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2E1, UGT1A6, UGT1A9, UGT2B7). За дел од овие гени спроведени се соодветни испитувања и во Р.Македонија. При тоа испитувано е влијанието на полиморфизмите на гените врз појавата на заболувањето, терапевтскиот исход, дозата која е потребна за да се постигне регулирана епилексија, концентрацијата на лекот во соодветен биолошки материјал и појавата на несакани ефекти од терапијата. Главна цел на овој труд е презентација на досегашните објавени светски податоци за влијанието на фармакогенетиката врз успехот на терапијата со АЕЛ и презентација на досегашните резултати на тоа поле во Р.Македонија. За реализирање на оваа цел направен е преглед на достапната литература на Pub Med за периодот 1990-2011 година. Клучни зборови користени при пребарувањето се: antiepileptic drugs, pharmacogenetics of antiepileptic drugs, pharmacoresistant epilepsy, single nucleotide polymorphism and antiepileptic drugs. Добиените податоци од извршеното пребарување се дополнети со добиените резултати од досегашните испитувања кои се реализираат во рамките на заедничка научно-истражувачка работа помеѓу Фармацевтскиот факултет-Скопје и Универзитетската Клиниката за неврологија, Медицински факултет – Скопје. Добиените податоци и резултати се однесуваат на влијанието на полиморфизми на гени врз резултатот од терапијата и тоа за: Carbamazepine (SCN1A IVS5N + 5 G→A; ABCB1 3435C→T; EPHX1c (416 A→G); EPHX1c (337 T→C)) Valproic acid (UGT1A6*2, c.541A>G, CYP2C9*2 (430 C→T), CYP2C9*3 (1075A→C), CYP2C19*3, 636G>A, CYP2C19*2, 681G>A)

ЛИТЕРАТУРА

- Löscher W et al. The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. *Epilepsia* 2009 Jan;50(1):1-23. Epub 2008 Jul 8.
- Szoeke CE et al. Update on pharmacogenetics in epilepsy: a brief review. *Lancet Neurol.* 2006 Feb;5(2):189-96.
- Tate SK et al. Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of antiepileptic drugs carbamazepine and phenytoin. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 2005 Apr 12;102(15);5507-12.
- Tan L et al. The influence of cytochrome oxidase CYP2A6, CYP2B6, and CYP2C9 polymorphisms on the plasma concentrations of valproic acid in epileptic patients. *Clin Neurol Neurosurg.* 2010 May;112(4):320-3. Epub 2010 Jan 20.



КЛИНИЧКА ФАРМАЦИЈА

постер презентации

CLINICAL PHARMACY

poster presentations

POTENTIAL DRUG-DRUG INTERACTIONS IN PATIENTS HOSPITALIZED IN THE INFECTIOUS DISEASES HOSPITAL 'MOTHER TERESA' IN TIRANA

Klejda Hudhra¹, Besnik Jucja², Gjergji Minga¹, Vigan Saliasi¹

¹Universiteti Amerikan i Tiranës, Fakulteti Mjekësor

²Universiteti i Tiranës, Fakulteti i Mjekësisë, Departamenti i Farmacisë 'Pirro Goda'

INTRODUCTION

Drug-drug interactions constitute one of the potential mechanisms leading to often preventable adverse drug events and health damage. The purpose of this study is to evaluate the profile of potential drug-drug interactions in hospitalized patients in the Infectious Hospital "Mother Teresa", since there are no previous studies on this issue in Albania.

MATERIAL AND METHODS

201 medical files were examined and were excluded those with only one drug. The selected medical files (patients) were investigated during the hospitalization period. Their prescriptions were analyzed once a week. Only gender, year of birth of patients, and drugs prescribed in the hospital files, were recorded. The analysis of potential drug-drug interactions (pDDIs) among prescribed drugs was performed through the Thompson Micromedex@1.0 program. Calculation of sums, frequencies and ratios were calculated using Microsoft Excel and StatPlus 2009.

RESULTS

Of all patients included in the study, 31.46% (56) experienced at least one pDDI. The mean number of pDDIs in files was 1.75 (range 1-6), SD 1.19. In most of the files only one interaction was found (35 files). Out of 98 identified pDDIs, most were of moderate and minor severity (65.66% and 16.17%, respectively) and their documentation was mainly good (51.52%) and fair (28.29%). Most frequently involved in potential DDIs were nonsteroidal anti-inflammatory drugs (24.5%), fluoroquinolones (22.4%), and aminoglycosides (14.3%).

CONCLUSION

The presence of drug interactions is a permanent risk in hospitals, as this study shows. The possibility of interactions was higher in patients taking medication for chronic diseases such as hypertension, diabetes etc. concurrently with medications for the infectious disease that caused hospitalization. The high frequency of pDDIs should be a concern for Albanian physicians, other health care professionalists and patients. This way, the utilization of computer programs, pharmacotherapy monitoring of patients, further divulgation and awareness to prevent harmful or clinically important drug-drug interactions and the pharmacist presence in the multidisciplinary team are some manners of contributing to hospitalized patients treatment. In the context of the evolving role of pharmacists, they should become an important factor in preventing and managing drug-drug interactions, especially in hospitalized patients.

REFERENCES

¹ Drug Interactions (page 1392) Daniel A. Hussar. Clinical Evaluation of Drugs, Encyclopedia of PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY, Third Edition, VOLUME 1, edited by James Swarbrick, 2007 by Informa Healthcare USA

² Juurlink D.N., Mamdani M., Kopp A., Laupacis A., Redelmeier D.A. (2003) Drug-drug interactions among elderly patients hospitalized for drug toxicity. Journal of the American Medical Association **289**: 1652-1658.

³ Bagheri H., Michel F., Lapeyre-Mestre M., Lagier E., Cambus J.P., Valdiguié P., Montastruc J.L. (2000) Detection and incidence of drug-induced liver injuries in hospital: a prospective analysis from laboratory signals. British journal of clinical pharmacology **50**: 479-484.

¹⁰ Angela D.M., Kashuba S.B., Joseph S.B. (2005) Drug Interactions in Infectious Diseases 13-39 Mechanisms of Drug Interactions I Absorption, Metabolism and Excretion.

¹¹ Goodman and Gilman's The pharmacological basis of Therapeutics, Chapter 5. The Science of Drug Therapy.

⁶ Raschetti R., Morgutti M., Menniti-Ippolito F., Belisari A., Rossignoli A., Longhini P., La Guidara C. (1999) Suspected adverse drug events requiring emergency department visits or hospital admissions. European journal of clinical pharmacology **54**: 959-963.

⁷ Budnitz D.S., Pollock D.A., Weidenbach K.N., Mendelsohn A.B., Schroeder T.J., Annet J.L. (2006) National surveillance of emergency department visits for outpatient adverse drug events.

Journal of the American Medical Association **296**: 1858-1866.

⁹ Katzung Basic & Clinical Pharmacology, tenth edition, 2007, McGraw-Hill, ISBN 978-88-299-1967-1973, page 1114

¹⁰ Atkinson J.A. Principles of clinical pharmacology second edition (2007), page 243, ISBN 13; 978-0-12-369417-1

¹¹ Martinbiancho J., Zuckermann J., Dos Santos L., Silva M.M. (2007) Profile of drug interactions in hospitalized children. Pharmacy Practice **5**: 157-161.

¹² Micromedex®

THE IMPACT OF ANTINEOPLASTIC DRUGS ON THE HEALTH OF HEALTHCARE PROFESSIONALS

Vigan Saliasi¹, Gjergji Minga¹, Dhurata Tarifa², Klejda Hudhra¹, Delina Hudhra¹

¹Universiteti Amerikan i Tiranës, Fakulteti Mjekësor

²Qendra Spitalore Universitare 'Nënë Tereza', Shërbimi Onkologjik

INTRODUCTION

The purpose of this study is to raise the awareness of medical staff working at the premises of the Oncological Services at the University Hospital Centre "Mother Teresa" with the risk of contamination with cytotoxic substances during their manipulation, and their knowledge of the Albanian legislation of Health Safety while exercising their profession.

MATERIAL AND METHODS

We analyzed Albanian legislation for the protection of employees who manipulate hazardous substances which cause severe health damage, especially among those who work with cytotoxic substances (antineoplastic drugs). The study was conducted through a questionnaire which was attended by employees of the Oncological Service at the University Hospital Centre "Mother Teresa" (physicians, pharmacists, nurses, cleaners) who were previously introduced to the questionnaire.

RESULTS

The review of the questionnaire showed that there are significant problems in terms of law enforcement and other legal acts in the protection of medical personnel from exposure to cytotoxic drugs during the exercise of their profession. Absence or ignorance of the legislation pointed out very clearly from the answers of the staff that are very different, an indication that the recognition of regulatory acts.

CONCLUSION

MOLSAEO specialists and those of the Ministry of Health must develop laws to ensure their protection from exposure to cytotoxic substances by approximating them with European legislation, to provide with biological safety cabinets the equipments of pavilions of this service, to determine the contamination degree of premises and staff of this service by cytotoxic subjects.

REFERENCES

1. Barbara Valanis, Dr, PhD, William Mr.Vollmer, Phd, Paul Steele, MPH, Occupational exposure to antineoplastic agents self-reported miscarriages and stillbirths among nurses and pharmacists: *Journal of Occupational & Environmental Medicine* vol.41, nr.8, 1990
2. Cytotoxic drugs and related waste: Safe handling in NSW Public Health System, 2008 p.4-6
3. CDC (Center for Disease Control and Prevention) & NIOSH (The National Institute for Occupational Safety medicine and Health) on line source, CDC.gov
4. Susan Martin, RN, DNSc, AOCN: The adverse health effects of occupational exposure to hazardous drugs. In *Community Oncology*, September/October 2005 vol 2 nr.5 review article
5. OSHA (occupational safety & Health Administration: on line www.OSHA.gov.OSHA Technical Manual page 1-30
6. Occupational Safety and Health Services, Department of Labour; New Zealand: Guidelines for the Safe handling of Cytotoxic Drugs and Related Waste, 1997
7. Kirklees NHS, Primary Health care Trust: Nursing Guidelines for Safe Handling and Administration of Cytotoxic Drugs. Online: www.kirklees.gov.uk, page 1-14
8. HSE Information, HSE Safe handling of Cytotoxic Drugs: on line (www.hse.gov.uk), 2003 page 1-7
9. Ministry of Labour, Ontario, Canada, Jeanne Beauchamp Hewitt, RN, PhD, University of Wisconsin, Milwaukee, 1997: Health effects of Occupational exposure to Antineoplastic Drugs: An Interactive Research, p.1-35
10. Prof. Alain Astier, PharmD, PhD: Oncology Pharmacy: Support the best Quality in Patients Care. In *European Journal of Hospital Pharmacy Practice (EJHPP)* and *ESMO (European Society of medical Oncology)*, supplement, 2008
11. Professor Samuel Limat, PharmD: The Role of Oncology Pharmacist in the Decision-Making Process, *EJHPP* and *ESMO*, supplement, 2008
12. Jean Francois Latour, PhD: Contaminations from Handling Cytotoxic Agents. *EJHPP&ESMO* supplement 2008, p.23-25
13. Dr. Gjergji Koja; Prof. As. Agim Shehi, Antoneta Njehrrrena, Ilir Minga: Legjislacioni Shëndetësor në Republikën e Shqipërisë për periudhën 1992-2010.
14. Esther Green BScN, mSCG; Mary Johnson, BSc, Maureen Trudeau, BSc, MA, MD; Susan Poirier, BSc Pharm, Gail Macartney RN(EC), BScH, MSc (A, CONCC), Deborah Miliken, BSc Pharm: "Safe Handling of Cytotoxics: Recommendation of Ontario" on *American Society of Clinical Oncology*, October, 9, 2008
15. Dhurata Tarifa, Agim Sallaku, Sotirag Lako: Kimioterapia dhe trajtimi sistematik i kancerit, 2007
16. Rang, Dale, Ritter, Flower: *Farmacologia*, 6a edizione, Elsevier, 2008, p. 723
17. Katzung: *Farmacologia generale e clinica*, 10a edizione inglese, Piccin, 2007, p. 887

INFLUENCE OF IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY ON BIOCHEMICAL PARAMETERS IN KIDNEY TRANSPLANT PATIENTS

Nikola Stefanovic¹,
Radmila Velickovic-Radovanovic^{1,2},
Aleksandra Catic-Djordjevic¹, Tatjana Cvetkovic^{1,2}

¹Medical Faculty, University of Nis, Nis, Serbia,

²Clinic of nephrology and haemodialysis, Clinical centre Nis, Serbia

INTRODUCTION

Combined immunosuppressive therapy in patients after kidney transplantation consists of tacrolimus, mycophenolate mofetil, corticosteroid and basiliximab. Due to narrow therapeutic range and highly variable pharmacokinetics of tacrolimus, as well as numerous side ef-

fects of drug immunosuppression, it is important to monitor biochemical parameters, which represent kidney and liver function.

OBJECTIVE

Monitoring of biochemical parameters in patients after renal transplantation who take combined immunosuppressive therapy. Also, we evaluate possibility to use biochemical monitoring in rational pharmacotherapy.

PATIENTS AND METHODS

This study was conducted among 30 patients with renal transplantation, who were on quaternary immunosuppressive therapy treated in the Clinic of nephrology and hemodialysis of Clinical Centre Nis, Serbia, during 2010. Determination of serum creatinine level (sCr), level of cholesterol (Chl), level of urea (Ure), level of triglyceride (Tg) and activity of following enzymes, alanin aminotransferaza (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyl transferase (GGT) and alkaline phosphatase (ALP) was performed little before transplantation as well as 7th, 14th, 21th, 60th and 180th day after transplantation. We used nonparametric Friedman test to analyse obtained results.

RESULTS

During the six-month period after transplantation, average values of sCr and Ure were significantly lower the pre-operative values ($p < 0.001$). Cholesterol post-operative values were significantly higher than pre-operative ($p < 0.001$), but tryglyceride levels became significantly higher two months after transplantation ($p < 0.001$). Activity of AST didn't change significantly during observing period. ALT, GGT and ALP activities were higher after transplantation ($p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively).

CONCLUSION

Obtained results show that biochemical monitoring in patients on combined immunosuppressive therapy is relevant indicator of rational pharmacotherapy.

REFERENCES

- Chen Y, Yheng K, Chen L, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus after the first oral administration in combination with mycophenolate mofetil and prednisone in Chinese kidney transplantation recipients. *Transplant Proc.* 2005;37:4246-4250.
- Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, et al. Time-related clinical determinants of long-term tacrolimus pharmacokinetics in combination therapy with mycophenolic acid and corticosteroids: a prospective study in one hundred de novo kidney transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43:741-762.
- Armstrong V, Oellerich M. New developments in the immunosuppressive drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, and azathioprine. *Clin Biochem.* 2001;34: 9-16.
- Kahan B, Keown P, Levy G, Johnston A. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clin Ther.* 2002; 24:330-350.
- Hoshinaga K, Aikawa A, Murai M, et al. Regimen of tacrolimus - based immunosuppression with basiliximab, mycophenolate mofetil, and low-dose steroid reduces acute rejection in kidney transplants. *Transplant Proc.* 2005;37:1762-1763.

SAME TARGET DIFFERENT PATHWAYS: CLINICAL PHARMACIST AND CLINICAL PHARMACOLOGIST

Golcorbin-Kon S.^{1,3}, Lalic-Popovic M.¹, Mikov M.²

¹Department of Pharmacy, Medical Faculty Novi Sad, Serbia

²Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Medical faculty Novi Sad, Serbia

³Faculty of Pharmacy, Podgorica, University of Montenegro

INTRODUCTION

Clinical pharmacist and Clinical pharmacologist have much in common. Both professionals aim to improve the safety and efficacy of treatments for the benefits of patients but there are clear differences.

DISCUSSION

Clinical pharmacist is part of a much larger group of professionals represented in most hospitals in developed countries. While formerly subordinate and restricted to supplying the medicines requested by the medical prescribers, the pharmacist's role has progressively developed to include monitoring outcomes of drug therapy and patient safety, report management and budgetary responsibilities. Pharmacists are now proficient to take on prescribing responsibilities in certain countries and have been actively involved in collaborative prescribing practices with physicians. They also take on much of the educational role related to rational prescribing that was once considered the realm of the clinical pharmacologists. Clinical pharmacist care for patients in all health care settings. They possess in-depth knowledge of medications that is integrated with a foundational understanding of the biomedical, pharmaceutical, sociobehavioral, and clinical sciences. To achieve desired therapeutic goals, the clinical pharmacist applies evidence based therapeutic guidelines, evolving sciences, emerging technologies, and relevant legal, ethical, social, cultural, professional and economic principles. Accordingly, clinical pharmacist assumes responsibility and accountability for managing medication therapy in direct patient care settings, whether practicing independently or in consultation/collaboration with other health care professionals. Clinical pharmacist researchers generate, disseminate, and apply new knowledge that contributes to improved health and quality of life. Within the health care system, clinical pharmacists are experts in the therapeutic use of medications. They routinely provide medication therapy evaluations and recommendations to patients and health care professionals. Clinical pharmacists are a primary source of scientifically valid information and advice regarding the safe, appropriate, and cost-effective use of medications. Pharmacists in community and ambulatory care settings are in a unique position to reduce drug-related morbidity and optimize patient outcomes by identifying, resolving, and preventing drug therapy problems.

Clinical pharmacologists are generally physicians with an additional degree in clinical pharmacology, many of whom are prescribers of medicine in active practice but are usually connected to academic units responsible for research and teaching. They belong to a well recognized but small sub-specialty of medicine.

CONCLUSION

Physician's education in the field of pharmacology and pharmacy has decreased. The pathway from pharmacy student to clinical pharmacist is usually shorter and cheaper than that from medical student to clinical

pharmacologist. Clinical pharmacists and clinical pharmacologists are accountable for the same target groups. Clinical pharmacy and clinical pharmacology share similar and parallel development, history, the same goal and the same financial resources (they compete for the same financial sources). Reality is that there is insufficient coverage by either group throughout the World. Many errors continue, drug related problems continue etc. The purpose of each is similar. They need to work together in order to improve care. Collaboration between clinical pharmacists and clinical pharmacologists should be possible. In practice, competition and domination of one group can always be discerned depending on the country or the area of the country. In short: clinical pharmacists, clinical pharmacologists interaction is the repetition of the historical relations between physicians and pharmacists: *déjà vu* phenomenon. Clinical pharmacists – clinical pharmacologists collaboration? It is important for the benefit of patients, education, authorities and clinical pharmacy and clinical pharmacology associations and development.

This work has been supported by Ministry of Science and Technological development of Serbia N° 41012

REFERENCES

- Czaky TZ., Clinical pharmacy and Pharmacology: Friends or Foes. J. Med Edu 1973;48:905-910
- DiPiro JT (editor) Encyclopedia of Clinical Pharmacy, Marsel Dekker, New York, Basel, 2003.
- Dollery CT., Clinical pharmacology – the first 75 years and view of the future. Br. J. Clin. Pharmacol. 2006; 61:650-665
- Hepler CD Clinical pharmacy, pharmaceutical care, and quality of drug therapy. Pharmacotherapy. 2004;24 (11):1491-1498
- Laters CM., Lessons learned from the past: A guide for the future of clinical pharmacology in the 21st century. J.Clin. Pharmacol. 2000;40:946-966
- Martin JE., Manasse HR., ASHP Leadership report on strategic direction: paving the way for pharmacy's future. Am J Health Syst Pharm 2006;63: 1549-1558
- Maxwell SRJ., Webb DJ., Clinical pharmacology – too young to die? Lancet 2006;367:799-800
- Park GD., A proposal for clinical pharmacy and clinical pharmacology collaboration Drug Intell Clin Pharm. 1986;20:310-311
- Rietord A., Nunn T., Launay-Vacher V., et al. European Fellowship for Pharmacists promoting clinical pharmacy in Europe. Pharm World Sci 2005; 27: 278
- Walker R., Edwards CRW. Clinical Pharmacy and Therapeutics, 3rd Ed. Churchill Livingstone, London 2003.

BONE MINERAL DENSITY IN WOMEN WITH RISK FACTORS FOR OSTEOPOROSIS

Tamara Vojnović¹, Tanja Lazova², Slobodan Gigov¹,
Ivana Indić¹, Jelena Živković¹, Jelena Gigov³

¹University of Novi Sad, Medical faculty, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad, Republic of Serbia

²AD Dr. Panoski – Skopje, Skupi 3 bb, Skopje, Republic of Macedonia

³Pharmacy "Galen", Cara Dušana 50, Novi Sad, Republic of Serbia

INTRODUCTION

The World Health Organisation defines osteoporosis as a bone mineral density (BMD) that is 2.5 standard deviations or more (as measured by dual-energy X-ray absorptiometry) below the reference mean for healthy, young white women. Reduced bone strength, which is determined by BMD and bone quality, predisposes increased risk of fractures. Measuring BMD by quantitative ultrasound (QUS) provides a determination of certain bone characteristics, related to the quality

and structure of bones, which can be useful for predicting the degree of fracture risk.

Study objectives is to determine bone mineral density, in women older than 40 years with at least one risk factor for osteoporosis, to predict the risk of fractures.

METHOD

In order to obtain data about presence of osteoporosis risk factors, 86 women, older than 40 years, were surveyed. Afterwards, out of 80 women, who had at least one risk factor, 17 were randomly chosen and their bone density was measured by BMD quantitative ultrasound.

RESULTS

Out of 86 respondents, 80 had at least one risk factor (93.02%). Mean of measured T-scores is -1.63.

DISCUSSION

Values of measured T-scores indicate an increased risk of fractures in women who have at least one osteoporosis risk factor. QUS parameters are better and more precise predictive indicators of risk factors for osteoporosis than well known clinical factors. However, they cannot be used in precise diagnosis of osteoporosis and axial BMD (DEXA) is necessary to be done.

CONCLUSION

The process of bone loss is 'silent' and that is the reason why persons with osteoporosis should be found, especially among female population, older than 40 years and with at least one risk factor present. Bone mineral density tests and early diagnosis of osteoporosis enable to take prevention measures or to start a treatment, which significantly decreases risk of fractures.

REFERENCES

1. <http://scindeks.nb.rs/article.aspx?query=ARTAK%26and%26osteoporoz&page=0&sort=1&stype=0&backurl=%2fSearchResults.aspx%3fquery%3dARTAK%2526and%2526osteoporoz&26page%3d0%26sort%3d1%26stype%3d0>
2. <http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0042-8450/2008/0042-845008129191.pdf>
3. <http://scindeks.nb.rs/article.aspx?query=ARTAK%26and%26QUS&page=0&sort=1&stype=0&backurl=%2fSearchResults.aspx%3fquery%3dARTAK%2526and%2526QUS%26page%3d0%26sort%3d1%26stype%3d0>
4. <http://scindeks.nb.rs/article.aspx?query=ARTAK%26and%26osteoporoz&page=16&sort=1&stype=0&backurl=%2fSearchResults.aspx%3fquery%3dARTAK%2526and%2526osteoporoz&26page%3d0%26sort%3d1%26stype%3d0>

MONITORING THE IMPLEMENTATION AND SECURITY OF MONTELUCAST IN CHILDREN

Marija Popović Milenković

Pharmacy Kragujevac

INTRODUCTION AND OBJECTIVE

Montelukast (Singulair) is leukotriene receptor antagonist. It is indicated for the prophylaxis and chronic treatment of asthma, for prevention of exercise-induced bronchoconstriction and for the relief of symptoms of seasonal allergic rhinitis. Goal of this paper is to investigate the most common therapeutic indications, populations that have most benefit from the drug, common adverse reactions, as well as how often these reactions occur.

METHODOLOGY

Research has been conducted in one pharmacy within Apoteka Kragujevac, Kragujevac, Serbia. The patients filled in questionnaire in pharmacy independently or with the help of pharmacist. Following questions were included:

Patient's age and sex

Indications, dosage and duration of montelukast usage

Has patient been informed what the drug was expected to achieve

Has patient been informed about adverse effects

All adverse effects have been taken from patient's leaflet. They have been divided to four groups, according to system: digestive disorders, nervous system/psychiatric disorders, respiratory system and other.

RESULTS AND DISCUSSION

40 patients of both sexes have been investigated. Among them, 40 percent have been females. Patients have been between 3 and 17 years old, with an average of 8. Duration of drug usage has been between 1 and 42 months, with an average of 10.7. Most common dosage has been 5 mg. Three most common indications have been asthma (72%), allergic rhinitis (23%) and exercise-induced bronchoconstriction. 60 percent of patients have been informed about adverse effects. 65 percent have not experienced any adverse effects. Of the remaining 35 percent, as much as 61 percent of patients have reported more than one adverse event. 54 percent of adverse events belong to nervous system/psychiatric group. 23 percent belong to respiratory disorders group. 11 percent belong to digestive group.

In nervous system/psychiatric group, aggressiveness (46%) and irritability (31%) have been most common. Cough (67%) and stomach ache have been most common effects in respiratory and digestive groups, respectively.

As much as 80 percent of patients have stated that they are satisfied with the drug. 20 percent have been partially satisfied, and no one has been dissatisfied.

CONCLUSION

Most disturbing result of this research is that as many as 40 percent of patients have not been informed about adverse effects, especially when one considers the fact the patients are children of age 1 to 10. Role of pharmacists in raising awareness of patients in regard to observing and reporting adverse effects should be reviewed.

Fact that two thirds of patients have not observed any adverse effect indicates that montelukast is relatively safe to use. However, this research has found that 60 percent of adverse effects belong to nervous system/psychiatric group. Therefore, warnings published on WHO site should not be taken lightly, and should be clearly communicated to patients and their parents.

REFERENCES

- Muijsers RB, Noble S. Montelukast: a review of its therapeutic potential in asthma in children 2 to 14 years of age. *Pediatric Drugs* 2002;4(2):123-39.
- Cobb DB, Abbott CL, Watson WA, Fernandez MC. Highdose montelukast exposures in a 3-year-old and a 5-year-old child. *Veterinary and Human Toxicology* 2002;44(2):91-2.
- Merck Sharp & Dohme Corp. Highlights of prescribing information – Singulair® (montelukast sodium) tablets, chewable tablets and oral granules Initial U.S. Approval:1998.
- http://www.who.int/medicines/publications/newsletter/PharmNewsletter09_5.pdf
- Virchow J. Chr., Bachert C. Efficacy and safety of montelukast in adults with asthma and allergic rhinitis. *Respiratory Medicine* 2006;100(11):1952-59.



**ФАРМАЦЕВТСКА
ХЕМИЈА /
БИОМОЛЕКУЛАРНИ НАУКИ**
орални презентации

**PHARMACEUTICAL
CHEMISTRY /
BIOMOLECULAR SCIENCES**
oral presentations

ELECTROCHEMICAL MONITORING OF ANTICANCER DRUGS-DNA INTERACTIONS BY SINGLE-USE SENSOR PLATFORMS

Arzum Erdem

Ege University, Faculty of Pharmacy, Analytical Chemistry Department, 35100 Bornova, Izmir, Turkey

Many electrochemical approaches have been developed for analyzing or quantification of nucleic acids and its interactions at the beginning of the sixties (1-13).

Various type of affinity biosensors as "Genosensor" for nucleic acid recognition processes have been rapidly developed combined with different nanomaterials towards the goal of simple and low-cost point-of-care detection of specific nucleic acid sequences related with genetic and infectious diseases. Eventually, genosensors could be applied to produce credit card-sized sensor arrays for clinical applications such as detection of pathogenic bacteria, tumors, and genetic disease, or for forensics (14).

The investigations at chemistry side based on DNA-drug interactions and DNA hybridization would provide new compounds to be tested for an effect on a biochemical target, and also to be used as promising hybridization indicators, or would provide new approaches for the design of more effective DNA hybridization biosensors based on nanomaterials, which will further become DNA microchip systems (6,10-12).

REFERENCES

- [1] E. Palecek, *Nature*, 1960, 188, 656.
- [2] M. I. Pividori, A. Merkoci, S. Alegret, *Biosensors and Bioelectronics*, 2000,15, 291.
- [3] J. Wang, *Nucl. Acids Res.*, 2000, 28, 3011.
- [4] E. Palecek, M. Fojta, *Anal. Chem.*, 2001, 73, 75A.
- [5] A. Erdem, M. Ozsoz, *Electroanal.*, 2002, 14, 965.
- [6] A. Erdem, P. Papakonstantinou, H. Murphy, *Anal. Chem.* 2006,78, 6656.
- [7] J. Wang, A.-N.Kawde, A. Erdem, M. Salazar, *Analyst*, 2001, 126, 2020.
- [8] A. Erdem, M.I. Pividori, A. Lermo, A. Bonanni, M. del Valle, S. Alegret, *Sensors and Actuators B: Chem.*,2006, 114, 591.
- [9] J. Wang, D.Xu, A. Erdem, R. Polisky and M. Salazar, *Talanta*, 2002, 56, 931.
- [10] A. Erdem, H. Karadeniz, A. Caliskan, *Electroanal.*, 2009, 21(3-5), 464.
- [11] H. Karadeniz, A. Erdem, F. Kuralay, F. Jelen, *Talanta*, 2009, 78 (1), 187.
- [12] A. Erdem, H. Karadeniz, A. Caliskan, *Analyst*, 2011, 136 (5), 1041.
- [14] W. G. Kuhr, *Nature Biotechnology*, 2000, 18, 1042.

Acknowledgements. A.E would like to express her gratitude to the Turkish Academy of Sciences (TUBA) as the associate member of TUBA for their financial support.

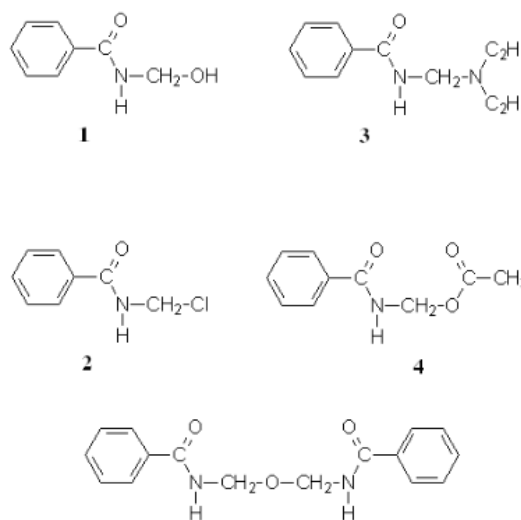
(BENZAMIDOMETHYL) TRIETHYLAMMONIUM CHLORIDE: A MILD AND VERSATILE REAGENT FOR BENZAMIDOMETHYLATION

Emil Popovski

Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Ss. Cyril and Methodius University, Arhimedova 5, 1000 Skopje, P.O. Box 162, Macedonia

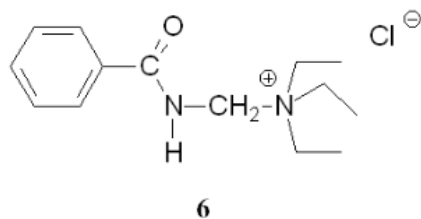
In the past, a large number of benzamidomethyl compounds have been synthesized which have been used for different purposes. In the final decade, in the case of a thiol group, benzamidomethylation was used for synthesis of ligands for ⁹⁹Tc complexes, which have been utilized as radiolabels. Also, benzamidomethylation was used to obtain some benzamidomethyl aryl thioethers as intermediates in the synthesis of benzothiazines. Among the numerous *S*-benzamidomethyl derivatives there are reports of a *S*-benzamidomethyl-L-cysteine, which was used in peptide synthesis and some of them are useful for the treatment of glaucoma. Amidomethyl and benzamidomethyl esters were synthesized and evaluated as potential prodrugs of carboxylic acid agents or amide agents. Also, mechanism of hydrolysis of benzamidomethyl derivatives of phenols indicates that *O*-benzamidomethyl derivatives of drugs with phenol group can be used as prodrugs. In the case of an amine group, amidomethylation was used for synthesis of derivatives of some uracils or thioracils that showed antitumor activity. Zlotin and coworkers investigated some routes for the synthesis of *N*-benzamidomethyl derivatives of functional derivatives of α -aminoacids and peptides, etc. Furthermore, synthesis of benzamidomethyl esters, such as 2-benzamidomethyl-3-oxybutanoates, which are used as intermediates in preparation of (2R,3S)-2-benzamidomethyl-3-hydroxybutanoates as chiral building blocks for synthesis of biologically active carbapenems, was conducted.

N-(Hydroxymethyl)benzamide (**1**) and *N*-(chloromethyl)benzamide (**2**) are reagents that have been widely used in reactions of benzamidomethylation. Also used, although more seldom, are *N*-(diethylamino)methyl)benzamide (**3**), *N*-(acetoxymethyl)benzamide (**4**), and dibenzamidomethyl ether (**5**).



In the course of our studies in benzamidomethylation of phenols, (benzamidomethyl)triethylammonium chloride (**6**) was obtained in a reac-

tion of **2** with triethylamine. Compound **6** was successfully used as a benzamidomethylation agent of phenols.



Reactions occurred fast, in mild conditions (RT; pH \geq 9) and in environmentally friendly solvent – water.

The corresponding benzamidomethyl ethers were obtained in high yields (> 90%) and easily isolated from the reaction mixture by simple filtration.

Alcohols were benzamidomethylated with **6**, too, but only in organic solvents. In these cases, the yields of the products were moderate.

In the case of thiols, thiophenols as well as alkylthiols were easily benzamidomethylated with **6** in aqueous media and yields of the products were also high.

Our good results with the benzamidomethylation of phenols and thiols using **6**, prompted us to investigate the reaction of this compound with other compounds with different nucleophilic functional groups. Primary and secondary amines as well as hydrazines and hydrazides react fast with **6** in aqueous media giving high yields of corresponding mono-, di-, three- or tetra-benzamidomethyl derivatives.

Also, in aqueous media dithiocarbamates can be benzamidomethylated plus inorganic nucleophiles such as the hydroxylamine, azide and cyanide anion.

Most interesting reactions of **6** are the reactions with enolate and similar carbanions. Novel carbon-carbon bonds were formed by S_N2 reactions performed in water.

Carboxylic acids can be benzamidomethylated with **6** but only in organic solvents. Yields of the corresponding esters were moderate.

Amino group in the presence of carboxylic group (at the same molecule) can be benzamidomethylated with **6** in aqueous media. However, attempt to benzamidomethylate phenol group in the presence of carboxylic group in aqueous media failed. The carboxylic group as a weak nucleophile in aqueous media does not react, but it deactivates the phenol group.

This phenomenon was used for synthesis of benzamidomethyl parabene as a novel potential antimicrobial agent. On the other hand, once the carboxylic group is protected as in benzamidomethyl parabene, the phenol group can be easily benzamidomethylated with **6** in aqueous media.

ANTIINFLAMMATORY ACTIVITY AND DOCKING STUDIES OF SOME β -HYDROXY- β -ARYL PROPANOIC ACIDS

Jelena Savić¹, Bojan Marković¹, Sanda Dilber², Marina Milenković³, Milena Jovčić⁴, Brižita Đrđević⁵

¹ Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University in Belgrade,

² Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University in Belgrade

³ Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, University in Belgrade

⁴ Pharmacy JovčićPharm, Novi Bečej

⁵ Department of Bromatology, Faculty of Pharmacy, University in Belgrade,

Six β -hydroxy- β -aryl propanoic acids [(3-hydroxy-3-(4-diphenylil)-butanoic acid, 3-hydroxy-2-methyl-3-(4-diphenylil)-butanoic acid, 3-hydroxy-2.2-dimethyl-3-(4-diphenylil)-butanoic acid, 3-hydroxy-3.3-diphenylpropanoic acid, 3-hydroxy-2-methyl-3.3-diphenylpropanoic acid, 3-hydroxy-2.2-dimethyl-3.3-diphenylpropanoic acid] were synthesised and evaluated for anti-inflammatory activity and gastric tolerability *in vivo*. Due to the fact that these acids belong to the aryl propanoic acid class of compounds, structurally similar to the NSAIDs, such as ibuprofen, anti-inflammatory activity is expected. The aim also was to determine using docking studies whether alpha methyl substitution has impact on COX-2 selectivity.

Synthesis of these compounds using modification of Reformatsky reaction has already been reported. The carrageenan induced paw oedema assay was carried out using procedures by Oyanagui and Sato. Male Wistar rats weighing 160-180g fasted overnight with free access to water were given orally *via* gavage needle either ibuprofen or tested compound dissolved in DMSO in different doses: 2.5 mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg, 15mg/kg, 20mg/kg. Each dose was given to six animals. Control group received only DMSO. One hour later 0.5% of carrageenan suspended in sterile saline and saline were injected in a volume of 0.1ml into the plantar surface of the right and left hind paw, respectively. Left paw served as the control one (non-inflamed paw). The animals were sacrificed 3 hours after the carrageenan and saline injection and paws were cut off for weighing. Difference in weight between right and left paw, active drug-treated *versus* vehicle-treated (control) rats, served as an indicator of the anti-inflammatory activity of tested drugs (compounds and ibuprofen). When animals were sacrificed, their stomach were removed and opened along the greater curvature. Lesions were examined under an illuminated magnifier (3 \times). The intensity of gastric lesions was assessed according to a modified scoring system of Adami *et al.* To identify potential anti-inflammatory lead among synthesised compounds docking calculations were performed using Autodock v4.0.1 into the 3D structure of the catalytic site of COX-2 enzyme (pdb code: 1cx2) and COX-1 enzyme (pdb code: 1eqg).

Range of ED₅₀ values is between 136.95 μ mol/kg and 14.79 μ mol/kg, while the result for ibuprofen is 51.7 μ mol/kg. None of tested substances or ibuprofen produced any significant gastric lesions. The changes observed were in range of 0-1 according to the Adami's scoring scale. Namely, only slight hyperemia or few petechiae registered in rat stomach regardless of given dose.

3-Hydroxy-3.3-diphenylpropanoic acid, 3-hydroxy-2-methyl-3.3-

diphenylpropanoic acid and 3-hydroxy-2,2-dimethyl-3,3-diphenylpropanoic acid form interactions with amino acid residues into all three cyclooxygenase anchor sites and they act as selective COX-2 inhibitors.

3-Hydroxy-2,2-dimethyl-3-(4-diphenyl)-butanoic acid and 3-hydroxy-2,2-dimethyl-3,3-diphenylpropanoic acid with two methyl groups at β -position possess the weakest anti-inflammatory activity.

The results indicate that all compounds possess significant anti-inflammatory activity after oral administration, but that 2-methyl-3-hydroxy 3,3-diphenyl-propanoic acid has greatest activity comparable to that of ibuprofen, a standard NSAID. Acids prepared from acetophenone have exhibited better anti-inflammatory activity than acids prepared from 4-acetylbiphenyl.

REFERENCES

- S.P. Dilber, Ž.S. Žižak, T.P. Stojković, Z.D. Juranić, B.J. Drakulić, I.O. Juranić. Antiproliferative activity of β -hydroxy- β -arylalcanoic Acids, *Int J Mol Sci* 2007; 8: 214-228.
- S.P. Dilber, S.L. Dobrić, Z.D. Juranić, B.D. Marković, S.M. Vladimirov, I.O. Juranić. Docking studies and Anti-inflammatory Activity of β -hydroxy- β -arylpropanoic Acids, *Molecules* 2008; 13: 603-615.
- J.T. Litchfield, F.A. Wilcoxon. A simplified method of evaluating dose-effect experiments, *J. Pharmacol Exp Ther* 1949; 96: 99.
- E. Adami, E. Marazzi-Uberti, C. Turba. Pharmacological research on gefarnate, a new synthetic isoprenoid with an anti-ulcer action, *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1964; 147: 113-145.
- G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A.J. Olson. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *J Comput Chem* 1998; 19: 1639
- Y. Oyanagui, S. Sato. Inhibition by nivaladipine of ischemic and carrageenan paw edema as well as of superoxide radical production from neutrophil and xanthine oxidase. *Arzneimittel-Forsch.* 1991, 41, 469-474

terminants for receptor selectivity between homomeric AMPA and KA receptors a series of rigid as well as flexible biaromatic alanine derivatives carrying selected hydrogen bond acceptors and donors has been synthesized based on the published X-ray structure of competitive antagonist (S)-ATPO co-crystallized with the ligand-binding domain of iGluR2 (S1S2J). The compounds were pharmacologically characterized by radioligand binding at native AMPA receptors in rat brain membranes and at homomeric recombinant rat iGluR1-7 receptors expressed in *Sf9* insect cell membranes. Based on these results as well as on the results obtained from molecular modeling studies, important structure-activity relationships at AMPA and KA were established. A group of compounds selective for either AMPA iGluR5 or iGluR7 receptors were identified. One particular substituent position appeared to be of special importance for control of ligand selectivity.

Suitable crystals for X-ray crystallography were obtained from (S)-EL-7-iGluR2 (S1S2J) complex. The structure was determined with a resolution of 1.9 Å. (S)-EL-7 is competitive antagonist slightly more potent than ATPO that prevents domain closure by two mechanisms. First, by direct interactions with the residues in domain 2 and steric interference between the receptor and ligand substituent, and the second mechanism acts by preventing the domain closure with interruption of interdomain interactions between Glu402 of domain 1 and Thr686 of domain 2. The new structure provides also interesting structural information on the water mediated interactions between the ligand and the particular amino acid residue Tyr702, which is the only one non-conserved amino acid residue among the four AMPA receptor subunits and has been identified as important determinant for AMPA receptor agonist subunit selectivity. This position is not responsible for the observed subunit selectivity of (S)-EL7 as it was expected. Another interesting finding is the domain closure which is in range between 6.9°-9.2°. This range of domain closure is in close to be in between what has been observed previously for antagonists (ATPO: 2.5°-5.1° and DNQX: 3°-6°) and partial agonist (KA:13°).

PHENYLALANINE DERIVATES, NEW SELECTIVE LIGANDS FOR AMPA- AND KAINATE RECEPTOR SUBUNITS OF IONOTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS

Serafimoska Zorica¹, Kapedanovska Nestorovska Aleksandra¹, Suturkova Ljubica¹, Tommy N. Johansen², Karla Frydenvang²

¹Institute for Pharmaceutical chemistry, faculty of Pharmacy, "St Cyril and Methodius" University Skopje,

²Department of Medical chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Copenhagen, Denmark

Ionotropic glutamate receptors (iGluRs) constitute a family of ligand gated ion channels subdivided in three classes, NMDA, AMPA (iGluR1-4) and KA (iGluR5-7 and KA1,2) according to the agonists that selectively activate them. iGluRs are tetrameric assemblies of highly homologous receptor subunits. They are critically important for normal brain function and are considered to be involved on neurological disorders and degenerative diseases such as schizophrenia, Alzheimer's disease, brain damage following stroke and epilepsy.

AMPA receptor antagonists are considered to have clinical potential as neuroprotective drug candidates. None of the competitive AMPA receptor antagonists known today is able to discriminate between individual AMPA and KA subunits. In order to identify the structural de-

ФЕНИЛАЛАНИНСКИ ДЕРИВАТИ, НОВИ СЕЛЕКТИВНИ ЛИГАНДИ ЗА АМПА- И КАИНАТНИТЕ РЕЦЕТОРНИ ПОДЕДИНИЦИ НА ЈОНОТРОПНИТЕ ГЛУТАМИНСКИ РЕЦЕПТОРИ

Серафимоска Зорица¹, Капедановска Несторовска Александра¹, Шутуркова Љубица¹, Томи Н. Јохансен², Карла Фриденванг²

¹Институт за фармацевтска хемија, Фармацевтски факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј"-Скопје,


²Институт за медицинска хемија, Факултет за фармацевтски науки, Универзитет од Копенхаген, Данска

Јонотропните глутамински рецептори (iGluRs) ја сочинуваат фамилијата на лиганд врзувачки јонски канали поделени во три класи, NMDA, AMPA (iGluR1-4) и KA (iGluR5-7 и KA1,2) според агонистите кои селективно ги активираат. iGluRs се организирани како тертамери од хомоложни рецепторни поединици. Тие се особено значајни за нормалната функција на мозокот и се смета дека се вклучени во

бројни невролошки пореметувања и невродегенеративни болести, како шизофренија, Алцхајмерова болест и мозочни оштетувања кои се јавуваат после мозочни удари и епилепсија.

Антагонистите на AMPA рецепторните поединици се смета дека се клинички значајни како невропротективни кандидати за лекови. Ниту еден од досега добиените конкуритивни AMPA рецепторни антагонисти не покажува селективност меѓу AMPA и KA рецепторните поединици. Со цел да се идентификуваат структурните детерминанти значајни за рецепторната селективност меѓу хомомерните AMPA и KA рецептори, беше синтетизирана серија како на ригидни така и на флексибилни биароматични аланински деривати кои содржат супституенти кои се акцептори и донори на водородни врски. Синтезата е направена врз на претходно публикуваната структура добиена со дифракција со x-зраци на конкуритивниот антагонист (S)-ATPO ко-кристализиран со лиганд-врзувачкиот домен на iGluR2 (S1S2J). Фармаколошката карактеризација на соединенијата е направена со врзување на лигандите со радиоактивен обележувач, со нативните AMPA рецептори во мембраните на мозок од стаорец и со хомомерни рекомбинантни iGluR1-7 рецептори од стаорец експресирани во *Sf9* инсектни клеточни мембрани. Врз основа на фармаколошките резултати како и врз основа на резултатите добиени од студиите на молекуларно моделирање, воспоставена е значајна структурата-активност зависност на овие соединенија кон AMPA и KA рецепторите. Идентификувана е група на соединенија селективни за AMPA, за iGluR5 или за iGluR7 рецепторите. Дефинирана е една карактеристична позиција на супституентите која е од особено значаење за контрола на селективноста на лигандите.

Добиени се кристали со кристалографија со x-зраци од комплексот (S)-EL-7-iGluR2 (S1S2J) Структурата е определена на резолуција од 1.9 Å. (S)-EL-7 е конкуритивен антагонист кој е малку попотентен од ATPO и го спречува затворањето на двата домените преку два механизми. Прво, преку директни интеракции со резидуите од доменот 2 и стените прчки меѓу рецепторот и супституентите на лигандот, а вториот механизам е преку спречување на затворањето на домените преку спречување на интердоменските интеракции меѓу Glu402 од доменот 1 и Thr686 од доменот 2. Новата структура исто така обезбедува интересни структурни информации за интеракциите посредувани преку молекулите на вода меѓу лигандот и карактеристичната аминокиселинска резидуа Tyr702, која е единствената аминокиселина која се разликува во AMPA рецепторните поединици и е окарактеризирана како значајна детерминанта на AMPA рецепторната селективност на агонистите. Оваа аминокиселина не е одговорна за селективноста на (S)-EL7, како што беше очекувано. Друго интересно сознание од оваа структура е затворањето на домените кое е во опсег од 6.9°-9.2°. Опсег кој се наоѓа меѓу претходно детерминираното затворање на домените предизвикано при врзување на iGluR2 со антагонистите (ATPO: 2.5°-5.1° и DNQX: 3°-6°) и парционалниот агонист (KA:13°).



**ФАРМАЦЕВТСКА
ХЕМИЈА /
БИОМОЛЕКУЛАРНИ НАУКИ**
постер презентациии

**PHARMACEUTICAL
CHEMISTRY /
BIOMOLECULAR SCIENCES**
poster presentations

ANGIOGENESIS INHIBITORS - NEW APPROACH TO TREATMENT OF MALIGNANT DISEASE

Vera Dabanović¹, Ana Pantović²

¹Public Pharmacy Institution of Montenegro "Montefarm", Podgorica,

²Pharmacy "Galen" Berane

INTRODUCTION AND OBJECTIVE

Angiogenesis is the process of creating new blood vessels from existing ones, which consists of the activation, proliferation and migration of endothelial cells. Activation of endothelial cells occurs under the influence of cytokines and the process of angiogenesis is regulated by various paracrine growth factors that are shared on stimulators and inhibitors. These molecules maintain balance, and consequently keep microvasculature in the state of rest. The state of excessive angiogenesis is the result of overweight of stimulators over inhibitors resulting various pathological processes. One of them is the growth of tumor. As angiogenesis plays a significant role in tumor growth, angiogenesis inhibitors thus represent an attractive therapeutic target. Only a few drugs are used in the clinical practice. Medicines approved by the FDA as antiangiogenic agents are: bevacizumab (anti-VEGF neutralizing antibody) and protein tyrosine kinase - sorafenib, sunitinib and pazopanib. A large number of drugs are currently in the different phases of clinical trials. The main objective of this article is to analyze and compare, data on efficacy of chemotherapy in combination with angiogenesis inhibitors vs. chemotherapy alone, from selected clinical trials. Primary objectives of these studies were: response rate, overall survival and progression-free survival.

METHODOLOGY

Most data were collected by searching large databases Medline and EMBASE where articles and meta-analysis concerning the effectiveness and safety of inhibitors of angiogenesis were looking for.

RESULTS AND DISCUSSION

Reviewed studies show high efficacy of angiogenesis inhibitors, especially, prolonged survival compared to standard regimes in the various indications such are: metastatic colorectal cancer, non-small cell lung cancer, metastatic Renal Cell Cancer and metastatic breast cancer.

CONCLUSION

Angiogenesis is a key process in tumor growth and progressive development of distant metastases. Angiogenesis inhibitors reduce tumor vascularity, which leads to regression of existing tumor blood vessels, inhibition of new tumor vasculature growth and consequently decreasing of tumor size. On the other hand, inhibition of angiogenesis leads to normalization of tumor vasculature and decreasing tumor interstitial pressure, thus increase the flow of cytostatics into the tumor, thereby increasing their effect.

ARYLPIPERAZINES ACTIVE ON 5HT_{1A} RECEPTOR - QSAR ANALYSIS

Iva Valkova, Irini Doytchinova

Faculty of Pharmacy, Medical University of Sofia, 2 Dunav st, 1000 Sofia, Bulgaria

The 5-HT_{1A} receptor is a subtype of 5-HT receptor that binds the endogenous neurotransmitter serotonin. It is a member of the G-protein-coupled (GPR) family of signal transducing receptors and modulate the release of dopamine as well as many hormones [1,2]. 5-HT_{1A} receptor influence various biological and neurological processes such as blood pressure and heart rate, aggression, appetite, cognition, learning, memory, mood [3,4]. 1-Aryl piperazines are well known 5-HT receptor ligands with 5-HT_{1A} activity [5]. The aim of the present study is to investigate the quantitative structure - affinity relationships in a series of aryl piperazines with terminal pyrid-2(1H)-on and diphenylmethylamino fragments at N4.

The data set consists of 34 compounds, tested previously for 5-HT_{1A} affinity [6-8]. The structures were built and optimized in HyperChem 7.5 (HyperCube Ltd.) by MM+ force field [9]. The electron density distribution and the set of electronic descriptors were calculated by semiempirical method AM1 [10]. Molecular properties and 3D descriptors were calculated by MDL QSAR software, version 2.2 (Symyx). LogP values were calculated by ACD Labs software (ACD Inc.). A genetic algorithm (GA) [11] and stepwise regression, as implemented in the MDL QSAR package, were used as variable selection procedures. The GA regression equations were generated on the basis of the selected variables by ordinary multiple linear regression (MLR). Both variable selection procedures, GA and stepwise regression, led to an identical model for affinity to 5-HT_{1A} receptor:

$$pK_i = -3.15q_{N1pip} - 0.01Vol + 21.69$$

$$n = 32 \quad r^2 = 0.7115 \quad SEE = 0.4635$$

$$F = 32.89 \quad q^2 = 0.65$$

The descriptor q_{N1pip} shows the partial atomic charge of piperazine N1 atom. The negative regression coefficient means that as more negative is the piperazine N1 atom as more affine is the compound. The charge of N1 depends on the aryl substituent. The inductive effect of the N1 substituents decrease in the order: o-methoxyphenyl > p-chlorophenyl. In the same order decreases the 5-HT_{1A} binding affinity of the investigated piperazines.

The descriptor Vol represents the molecular volume of a molecule computed by the grid method. Volume of the investigated structures ranges from 278.56 to 485.87. The negative correlation between Vol and affinity suggests that bulky substituents at piperazine N4 are not favor for the 5-HT_{1A} affinity. Elongation of the spacer also increases Vol and should decrease affinity.

The 2D-QSAR study reveals the structural features responsible for the affinity of 5-HT ligands with o-methoxyphenyl and p-chlorophenyl substituent at N1 and terminal pyrid-2(1H)-on and diphenylmethylamino fragments at N4. The results from the QSAR study could directed to future synthesis of ligands.

REFERENCES

1. Frazer A, Hensler JG (1999). "Chapter 13: Serotonin Receptors". In Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. Philadelphia: Lippincott-Raven. pp. 263-292.

2. Van de Kar LD, Levy AD, Li Q, Brownfield MS. (1998). "A comparison of the oxytocin and vasopressin responses to the 5-HT_{1A} agonist and potential anxiolytic drug alprazolam (S-20499)". *Pharmacol Biochem Behav.* **60** (3): 677-683.
3. Dabiré H. (1991). "Central 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors in blood pressure regulation.". *Thérapie.* **46** (6): 421-9
4. Ögren SO, Eriksson TM, Elvander-Tottie E, D'Addario C, Ekström JC, Svenningsson P, Meister B, Kehr J, Stiedl O (2008). "The role of 5-HT_{1A} receptors in learning and memory". *Behav Brain Res.* **195** (1): 54-77.
5. S. J. Oh, H. J. Ha, D. Y. Chi, H. K. Lee, *Curr. Med. Chem.* **8** (2001) 999-1034
6. Paluchowska M, Bugno R, et al. (2001). "Substitution mode of the amide fragment in some new N- ω -[4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]alkyl]pyrid-2(1H)-ones and their 5-HT_{1A}/5-HT_{2A} activity". *Pol.J.Pharmacol.* **53**:369-376
7. Paluchowska M, Bugno R, et al. (2002). "Novel N- ω -[4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]ethyl]pyrid-2(1H)-ones with diversified 5-HT_{1A} receptor activity". *Pol.J.Pharmacol.* **54**:641-646
8. Paluchowska M, Charakchieva-Minol S, et al. (2004). "New 4-[β -(diarylmethylamino)alkyl]- and 4-[ω -(diarylmethoxy)alkyl]-1-arylpiperazines as selective 5-HT_{1A}/5-HT_{2A} receptor ligands with differentiated *in vivo* activity". *Pol.J.Pharmacol.* **56**:743-754
9. A. Hocquet, M. Langgard, *J. Mol. Model.* **4** (1998) 94-112
10. M. J. S. Dewar, E. G. Zebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **107** (1985) 3902-3909
11. R. Leardi, R. Boggia, M. Terrile, *J. Chemometrics*, **6** (1992) 267-281

IN VITRO STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF α , β -UNSATURATED CARBOXYLIC ACIDS AND α -BROMO-CARBOXYLIC ACIDS

Sara Filipović¹, Marina Milenković¹, Sanda Dilber², Vesna Vitnik³, Tanja Jovanović⁴, Željko Vitnik⁵

¹Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, ²Institute of Organic Chemistry Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, ³Department of Chemistry IChTM, University of Belgrade, Serbia,

⁴Institute of Inorganic Chemistry Faculty of Pharmacy, University of Belgrade

⁵Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Serbia

INTRODUCTION

The purpose of this study was to test α , β -unsaturated (**1,2,3,4,5,6,7**) carboxylic acids and α -bromo (**8,9**) carboxylic acids as potential antimicrobial agents.

MATERIALS AND METHODS

The antimicrobial activity was evaluated using nine laboratory control strains of bacteria Gram positive: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) and Gram negative: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (NCIMB 9111), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), and two strains of yeast: *Candida albicans* (ATCC 10231 and ATCC 10259). A broth microdilution method was used to determine minimal inhibitory concentration (MIC) of tested compounds according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2005). All tests were performed in Müller Hinton broth for bacterial strains and in Sabouraud dextrose broth for *Candida albicans*. Overnight broth cultures of each strain were prepared, and the final concentration in each well was adjusted to 2×10^6 CFU/ml for bacteria and 2×10^7 CFU/ml for yeasts. The investigated acids were dissolved in 1% dimethylsulfoxide (DMSO) and then diluted to the

highest concentration. A serial doubling dilution of the compounds were prepared in a 96-well micotiter plate over the range of 31.25-1000 μ g/ml. In the tests, triphenyl tetrazolium chloride (TTC) (Aldrich Chemical Company Inc. USA) was also added to the culture medium as a growth indicator. The final concentration of TTC after inoculation was 0.05%. The microbial growth was determined after 24 h of incubation at 37 °C, for bacteria, and at 25 °C after the 48 h for fungi. The MIC is defined as the lowest concentration of the acid at which the microorganism does not demonstrate visible growth. All determinations were performed in duplicate and two positive growth controls were included.

The investigated acids were obtained in phase-transfer catalyzed (PTC) reactions of ketones with bromoform and aqueous lithium hydroxide in alcoholic solvent with TEBA or 18-C-6 as catalyst. We used: Cyclohexene-1-1-carboxylic acid **1**, 4-terc-Butyl-cyclohex-1-enecarboxylic acid **2**, 3-Methyl-cyclohex-1-enecarboxylic acid **3**, 4-Phenyl-cyclohex-1-enecarboxylic acid **4**, 4-Ethyl-cyclohex-1-enecarboxylic acid **5**, 2-Phenyl-but-2-enoic acid **6**, 2-Phenyl-acrylic acid **7**, Bromo-piperidine-1,4-dicarboxylic acid **8** and 4-Bromo-piperidine-1,4-dicarbocilic acid monoethyl ester **9**.

RESULTS

The investigated acids exhibited similar antimicrobial activity against Gram positive bacteria which were more sensitive (the MIC values were in the range from 125-500 μ g/ml) than Gram negative bacteria. The best activity exhibited acids 6,7,8 and 9 which were active against Gram positive bacteria and both strains of yeast *Candida albicans*. We can conclude that tested complexes exhibited significant antimicrobial activity and should be considered as potential antimicrobial agents. The purpose of further studies will be to elucidate the possible mechanism/mechanisms of action.

REFERENCES

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 15th Informational Supplement. CLSI Document M100-S15. Wayne, PA, USA; 200
- [2] V.D. Vitnik, M.D. Ivanović, Ž.J. Vitnik, J.B. Đorđević, Ž.S. Žižak, Z.D. Juranić, I.O. Juranić, "One-step conversion of ketones to conjugated acids using bromoform", *Synthetic Communications*, 2009,39(8), 1457-1471.

SYNTHESIS AND INVESTIGATIONS OF SOME 8-SUBSTITUTED DERIVATIVES OF 1,3,7-TRIMETHYLXANTHINE

Al. Zlatkov, Pl. Peikov

Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, 2 Dunav Street, 1000 Sofia, Bulgaria

The aim of the current study is to introduce a heterocyclic molecule at C8 position of the relatively long side chain of the 1,3,7-trimethylxanthine, which would lead to potentially higher lipophilic properties. This would improve their transition through the blood brain barrier and manifest some effects on CNS. In order to achieve this a few derivatives of 8-substituted 1,3,7-trimethylxanthines were prepared and the synthesis thereof was investigated.

Melting points were measured in °C and corrected (Büchi 535). The FTIR spectra 400 – 4000 cm^{-1} were recorded on a Nicolet iS10 FT-IR

Spectrometer in KBr. ^1H - and ^{13}C -NMR spectra were recorded at ambient temperature on a Bruker-250 WM (250 MHz) spectrometer. Chemical shifts were expressed as values in ppm against TMS as an internal standard. Preparative thin-layer chromatography was performed on DCAufolien Kieselgel 60 F254 (Merck) (0.20 mm) sheets with solvents (vol. parts): chloroform-acetone-ethanol (3:3:4), detected at UV 254 nm. The given yields are those of analytically pure product. No efforts were made to optimize the yields.

The amination of 8-bromocaffeine with the corresponding aminoalcohol was carried out at temperature of 130°C , in the absence of solvent, whereat the reaction time is established to be 15 - 25 min. This method ensures high yields of the obtained 8-(hydroxyalkyl)-aminocaffeines. The isolated caffeine derivatives react with excess of hydrobromic acid and after cooling the synthesized 8-(bromoalkyl)-aminocaffeines are separated as crystal mass. The reaction ends with close to quantitative yields.

Then synthesized 8-(2-(bromoethyl)-, respectively 8-(3-(bromopropyl)-amino)-caffeine interact with sodium salts of 4-ureido-2,5-2,5-dioxoimidazole and 2,3-dihydro-3-oxobenzisulphonazole to yield four new N-substituted 8-aminocaffeines.

The corresponding yields are between 25% and 89%. The obtained products are white crystals substances, insoluble in chloroform, acetone and ethylacetate and moderately soluble in water and alcohols. The new compounds were characterised by microanalyses, FTIR and NMR spectrometry and results were consistent with the assigned structures.

The investigations of studied compounds for acute toxicity and antihypoxic activity are forthcoming.

Four new N-substituted 8-aminocaffeine derivatives with fragments of 4-ureido-2,5-2,5-dioxoimidazole (allantoine) and 2,3-dihydro-3-oxobenzisulphonazole (saccharin) in the side chain were synthesized. The structures were characterised by microanalyses, FTIR and NMR spectrometry and results were consistent with the assigned structures. Using the spectral data it was clearly demonstrated that 2,5-dioxo-4-ureidoimidazolidine moiety was bound to the alkyl side chain at position 1, and not at position 3. The investigations of studied compounds for acute toxicity and antihypoxic activity are forthcoming.

QSAR STUDY OF BILE ACIDS HAEMOLYTICAL POTENTIAL

Mihalj Poša

Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia

In the mechanism of promotory action of bile acids on the transport of certain drugs through the cell membrane an important role plays their interaction with membrane phospholipids. It should be also noticed that bile acids damage cell membranes by withdrawing phospholipids from them [1]. The increased promotory effect on drug transmembrane transport means at the same time an increased membranolytic effect of bile acids. Bearing the above in mind it was interesting to study the effect of the structure of bile acid molecules on their haemolytic potential as a measure of their membranolytic activity [2-4]

Measurements of haemolytic potential was determined from citrate rabbit blood [2] for 30 bile acid (BA) molecules of belonging to three li-

near congeneric groups, with three (Group I) and two (Group II) oxygen atoms from OH or oxo groups bound to the steroid skeleton, and glyco conjugated cholic acid and glyco conjugated cholic acid derivatives (Group III). The haemolytic potential (Lys100) values (bile acid concentration at which 100 % lysis of erythrocyte membrane occurs), are related to the structure of the steroid nucleus by constructing a novel molecular descriptors with 2D and 3D characteristics of topological descriptors. Namely, with conventional topological descriptors (first-order connectivity index, third-order connectivity index, Wiener-index, Balaban-index, molecular topological index, cluster count, etc.) BA molecules from the same congeneric group have identical values, so that these descriptors can not be used to form a new model for the given congeneric group [5].

The linear regressions (models) obtained in this work for each congeneric group relate the Lys100s to this new descriptor. Statistical parameters of these models, as well as their predictivity, indicate the significance of the obtained equations, that is that the haemolytic potential (Lys100) is influenced not only by the number of OH and oxo groups in the steroid nucleus, but also by their steric environment [6]. *The work was financially supported by the Secretariat of Science and Technological Development, AP Vojvodina, Republic of Serbia, Grant No.114-451-2113/2011.*

REFERENCES

- M. Mikov, J.P. Fawcett, editors, Bile Acids, Geneva, Medishet Publisher, 2007.
- M. Poša, K. Kuhajda: Hydrophobicity and haemolytic potential of oxo derivatives of cholic, deoxycholic and chenodeoxycholic acids, Steroids 75(6) (2010) 424-431.
- M. Poša, Z. Farkaš, Cholesterol solubilization by oxo derivatives of selected bile acids and their osmotic resistance, Collection of Czechoslovak Chemical Communications 75(8) (2010) 767-784.
- M. Poša, K. Kuhajda, Influence of bile acids on the adsorption of lidocaine and verapamil in an *in vitro* experiment, Journal of the Serbian Chemical Society 75(4) (2010) 433-440.
- M. Poša, QSPR study of the effect of steroidal hydroxy and oxo substituents on the critical micellar concentrations of bile acids, Steroids 76(1-2) (2011) 85-93.
- M. Poša, A. Pilipović, M. Lalić, The influence of NaCl on hydrophobicity of selected, pharmacologically active bile acids expressed with chromatographic retention index and critical micellar concentration, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 81 (2010) 336-343.

SYNTHESIS OF NOVEL HYDRAZONES DERIVATIVES OF 5-BROMO-SALICYLALDEHYDE BENZOYLHYDRAZONE AS POTENTIAL ANTICANCER AGENTS

Boriana Nikolova-Mladenova, Darvin Ivanov

Department of Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University - Sofia, 2 Dunav Str., 1000 Sofia, Bulgaria

INTRODUCTION

Aroylhydrazones derived from salicylaldehyde are compounds with interesting biological properties including a high anticancer activity [1]. Salicylaldehyde benzoylhydrazone (SBH) is an unusually potent inhibitor of DNA synthesis and cell growth in a variety of cultured human and rodent cells. Various derivatives of salicylaldehyde benzoylhydrazone have been synthesized in order to discover new more effective antiproliferative agents [2-6].

OBJECTIVES

The aim of our research was to design and synthesized new SBH analogs derived from 5-bromo salicylaldehyde and different acid hydrazides.

METHODS

In the present study we report synthesis and physicochemical characterization of two new hydrazones - 5-bromo-salicylaldehyde 4- hydroxy-benzoylhydrazone and 5-bromo-salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. The compounds were prepared by the Schiff base condensation between 5-bromo salicylaldehyde and 4- hydroxy-benzhydrazide or isonicotinoyl hydrazide in ethanol. The structures of the new hydrazones were confirmed by elemental analyses, IR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectroscopy. The cytotoxic activity of the new compounds was assessed using the MTT dye reduction assay.

RESULTS AND CONCLUSIONS

Two new potential anticancer compounds were synthesized and were tested for *in vitro* cytotoxic activity on a panel of human leukemic and tumor cell lines.

REFERENCES

- [1] Savini L., Massarelli P., Travagli V., Pellerano C., Novellino E., Cosentino S., et al. New α -(N) heterocyclic hydrazones: evaluation of anti-cancer, anti-HIV and antimicrobial activity. *Eur J Med Chem.* 2004;39:113-22
- [2] Ponka P., Borova J., Neuwirt J., Fuchs O. Mobilization of iron reticulocytes. *FEBS Lett.* 1979;97:317-21
- [3] Richardson D R., Bernhardt P. V. Crystal and molecular structure of 2-hydroxy-1-naphthaldehyde isonicotinoyl hydrazone (NIH) and its iron (III) complex: an iron chelator with anti-tumor activity. *J Biol Inorg Chem.* 1999;4:266-73.
- [4] Johnson DK, Murphy TB, Rose NJ, Goodwin WH, Pickart L. Cytotoxic chelators and chelates 1. Inhibition of DNA synthesis in cultured rodent and human cells by aroylhydrazones and by a copper (II) complex of salicylaldehyde benzoyl hydrazone. *Inorg Chim Acta.* 1982; 67:159-65.
- [5] Pickart L, Goodwin WH, Murphy TB, Johnson DK, *J Cell Biochem Suppl.* 1982;6:L482.
- [6] Pickart L, Goodwin WH, Burgua W, Murphy TB, Johnson DK. Inhibition of the growth of cultured cells and an implanted fibrosarcoma by aroylhydrazone analogs of the Gly-His-Lys-Cu (II) complex. *Biochem Pharmacol.* 1983;32:3868-71.

AN UNEXPECTED PRODUCT FROM THE REACTION OF ACENOCOUMAROL AND PHOSPHORYL CHLORIDE

E. Stanojevska¹, K. Mladenovska¹,
A. Poceva Panovska¹, B. Mikhova², E. Popovski³

¹University "Ss Cyril and Methodius", Faculty of Pharmacy,
Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia

²Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry,
Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev Str., Build. 9,
1113 Sofia, Bulgaria

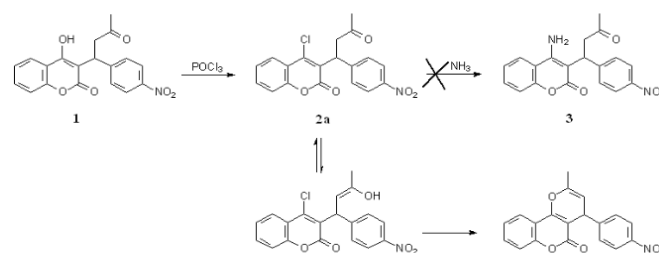
³Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences and Mathematics,
Ss. Cyril and Methodius University, Arhimedova 5, 1000 Skopje,
P.O. Box 162, Macedonia.

INTRODUCTION

Coumarins are large class of compounds with the common structure of benzo- α -pyrone (2H-1-benzopiran-2-one). The family of coumarins is characterized by wide structural diversity. According to the substitu-

tion in benzene and pyrone rings they can be generally classified in the following categories: (i) simple coumarins, (ii) furano-coumarins,

Scheme 1



(iii), pyranocoumarins, (iv) biscoumarins and triscoumarins, and (v) coumarinolignans.

Simple coumarins and their analogues, such as bis and tris-coumarins continually attract research interest due to their diverse biological activities, such as anticoagulant, anti-inflammatory, anti-tumoral, antimicrobial and antioxidant activity. Also, they have been reported to be CNS active and possess enzyme inhibition properties. These properties of coumarins made them very attractive for re-design, organic synthesis and development [1].

Acenocoumarol (**1**) [(*RS*)-4-hydroxy-3-[1-(4-nitrophenyl)-3-oxobutyl]-2*H*-chromen-2-one, logP 1,98; logS (predicted) -4,53] is an anticoagulant that functions as a vitamin K antagonist. Molecule of acenocoumarol has a single chiral center that gives rise to two different enantiomeric forms. (*R*)-(+)-Acenocoumarol has a longer plasma elimination half-life and slower plasma clearance, compared to the (*S*)-(-)-enantiomer. Related to these pharmacokinetic characteristics, (*R*)-(+)-acenocoumarol is more potent *in vivo* as an anti-coagulant than the (*S*)-(-)-enantiomer and is largely responsible for the overall anticoagulant response [2]. Acenocoumarol is metabolized predominantly by CYP2C9, while its target on the enzyme vitamin K epoxidase is VKORC1. Genetic variants in CYP2C9 and VKORC1 are associated with variability in coumarin anticoagulant dose requirement, over-anticoagulation, bleeding risk and stabilization [3, 4].

Starting from acenocoumarol as a leading compound our aim was to synthesize a novel 4-amino derivate of acenocoumarol. Due to the electronic similarity of oxygen (hydroxyl group) and nitrogen (amino group) we supposed that (*RS*)-4-amino-3-[1-(4-nitrophenyl)-3-oxobutyl]-2*H*-chromen-2-one (**3**) could be a potential bioisostere of acenocoumarol.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis of

(*RS*)-2-methyl-4-(4-nitrophenyl)pyrano(-)[3,2-*c*]chromen-5-one (**4**)

The mixture of (*RS*)-Acenocoumarol (Alkaloida Chemical Co) and POCl₃ (Merck Chemicals) was heated at 70 °C for 4 hours. Afterwards, the reaction mixture was cooled to room temperature then slowly poured onto crushed ice and stirred for 45 min. Crystals of **4** were formed, which were separated by filtration and washed with cold water.

The obtained compound was characterized by FTIR, ¹H-NMR (**Fig. 1**) and ¹³C-NMR (**Fig. 2**) spectra.

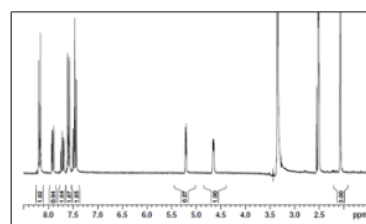


Fig. 1. ¹H-NMR spectra of **4**

RESULTS AND DISCUSSION

First, the reaction of **1** with phosphoryl chloride was performed to obtain 4-chloro derivative **2a**. Subsequently, target compound **3** was planned to be obtained in nucleophilic reaction of ammonia with intermediate **2a** (Scheme 1). However, after the first step and replacement of the hydroxyl group in position 4 at coumarin moiety, unplanned cyclization occurred. With intramolecular nucleophilic attack, oxygen from hydroxyl group at enolate form **2b** replace chlorine atom resulting in formation of compound **4**. The reaction was performed at three different temperatures (70 °C, 90 °C and boiling temperature of phosphoryl chloride) in order **2a** to be obtained and isolated. However, in all the reaction conditions, as a product of reaction, the compound **4** was obtained. Thus, the future research will be aimed to synthesize and isolate compound **2a** as intermediate for obtaining novel compounds with potential anticoagulant activity.

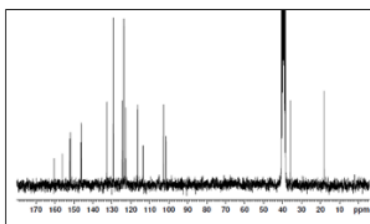


Fig. 2. ¹³C-NMR spectra of 5

REFERENCES

- F. Borges, F. Roleira, N. Milhazes, L. Santana and E. Uriarte. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. *Current Medicinal Chemistry*, 2005, 12, 887-916.
- Ufer, M. Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol. *Clin. Pharmacokinet.* 2005 44(12), 1227-1246
- M. Beinema; J. R. B. J. Brouwers; T. Schalekamp; B. Wilffert. Pharmacogenetic differences between warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon. *Thromb Haemost* 2008; 100, 1052-1057.
- D. Tassies, C. Freire, J. Pijoan, S. Maragall, J. Monteagudo, A. Ordinas, J. C. Reverter. Pharmacogenetics of acenocoumarol: cytochrome P450 CYP2C9 polymorphisms influence dose requirements and stability of anticoagulation. *Haematologica* 2002, 87, 1185-1191.

НЕОЧЕКУВАН ПРОДУКТ ПРИ РЕАКЦИЈА НА АЦЕНОКУМАРОЛ И ФОСФОРИЛ ХЛОРИД

Е. Станоевска¹, К. Младеновска¹,
А. Поцева Пановска¹, Б. Микхова², Е. Поповски³

¹ Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирли и Методиј, Водњанска 17, Скопје, Македонија

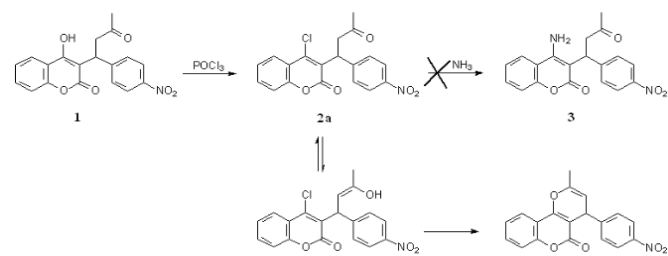
² Институту за органска хемија со центар за фитохемија, Бугарска Академија на Науките, Ул. Академик Г.Бончев, Софија, Бугарија

³ Институт за хемија, Природно-математички факултет, Универзитет Св. Кирли и Методиј, Архимедова 5, Скопје, Македонија

ВОВЕД

Кумарините се голема класа соединенија кои во својата структура го содржат прстенот на бензо- α -пирон (2H-1-бензопирон-2-он). Фамилијата на кумарините се карактеризира со широка структурна различност и во зависност од супституентите на бензеновиот и пиронскиот прстен, кумарините се класифицирани во следните категории: (а) едноставни кумарини, (б) фурано кумарини, (в) пирано

Схема 1



кумарини (г) бис и трискумарини и (д) кумаринолигани. Едноставните кумарини и нивните аналози, како бис и трис кумарините постојано го привлекуваат научниот интерес пред се заради нивната широка биолошка активност и тоа како антикоагуланси, антиинфламаторни, антитуморни, антимикробни и антиоксидантни агенси. Докажано е дека овие соединенија се активни и на ниво на централниот нервен систем, а поседуваат и својства на ензимски инхибитори. Заради наведените особини кумарините се особено интересни од аспект на нивно ре-дизајнирање, синтеза и понатамошен развој [1].

Аценокумаролот (**1**) [(*R,S*)-4-хидрокси-3-[1-(4-нитрофенил)-3-оксобутил]-2H-хромен-2-он, logP 1,98; logS (предвидена) -4,53] е антикоагуланс кој делува како антагонист на витаминот К. Молекулот на аценокумаролот има еден хирален центар кој укажува на постоење на две енантиомерни форми. (*R*)-(+)-аценокумаролот има подолго полувреме на плазма елиминација и побавен плазматски клиренс споредено со (*S*)-(-)-енантиомерот. (*R*)-(+)-енантиомерот е попотентен *in vivo* како антикоагуланс од (*S*)-(-)-енантиомерот, и воглавно е одговорен за севкупниот антикоагулантен одговор [2].

Аценокумаролот се метаболизира воглавно со CYP2C9, додека негова цел на ензимот витамин К епоксидаза е VKORC1. Генетските варијации во CYP2C9 и VKORC1 се асоцирани со варијабилноста во потребната доза на аценокумаролот, прекумерна антикоагулација, опасност од крварење и стабилизација [3,4].

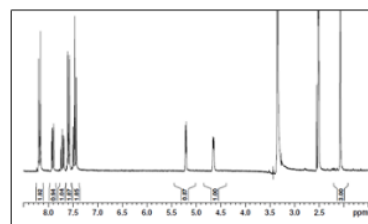
Тргувајќи од аценокумаролот како водечко соединение, целта на овој труд беше да се синтетизира нов 4-аминодериват на аценокумаролот. Заради електронската сличност на кислородниот атом (хидроксилна група) и азотниот атом (амино група) претпоставивме дека (*R,S*)-4-амино-3-[1-(4-нитрофенил)-3-оксобутил]-2H-хромен-2-он (**3**) може да биде потенцијален биоизостер на аценокумаролот.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Синтеза на

(*R,S*)-2-метил-4-(4-нитрофенил)пирано(-) [3,2-с]хромен-5-он (**4**)

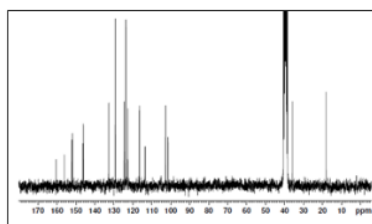
Смесата од (*R,S*)-Аценокумарол (Alkaloida Chemical Co.) и фосфорил хлорид (POCl₃) (Merck Chemicals) беше загревана на 70 °C во период од 4 часа. Понатаму, реакционата смеса беше оладена до собна температура а потоа беше истурена во ситно здробен мраз и постојано мешана за време од 45 мин. Притоа беа формирани кристали од **4** кои беа филтрирани и премиени со ладна вода. Добиеното соединение беше карактеризирано со FTIR, ¹H-NMR (Сл. 1) и ¹³C-NMR (Сл. 2).



Сл. 1. ¹H-NMR спектар на 4

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Реакцијата на **1** со фосфорил хлорид беше изведена за да се добие 4-хлоро дериватот на аценокумаролот **2a**. Понатаму добивањето на целното соединение **3** беше планирано преку реакција на амониак со интермедиерот **2a** (Шема 1). Меѓутоа, во првиот чекор, покрај супституцијата на хидроксилната група на положба 4 во кумаринскиот дел, се одвива и непланирана циклизација. Во интрамолекуларна нуклеофилна реакција, кислородниот атом од хидроксилната група на енолатната форма **2b** го заменува хлорниот атом при што беше добиено соединението **4**. Иако реакцијата беше изведена на три различни температури (70 °C, 90 °C и Тв на фосфорил хлоридот), во сите обиди како продукт на реакцијата беше изолирано соединението **4**. Оттука, понатамошните истражувања ќе се насочат кон синтеза и изолација на соединението **2a** како интермедиер за добивање на нови соединенија со потенцијална антикоагулативна активност.



Сл. 2. ¹³C-NMR спектар на **4**

РЕФЕРЕНЦИ

- F. Borges, F. Roleira, N. Milhazes, L. Santana and E. Uriarte. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. *Current Medicinal Chemistry*, 2005, 12, 887-916.
- Ufer, M. Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol. *Clin. Pharmacokinet.* 44(12), 1227-1246
- M. Beinema; J. R. B. J. Brouwers; T. Schalekamp; B. Wilffert. Pharmacogenetic differences between warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon. *Thromb Haemost* 2008; 100, 1052-1057.
- D. Tassies, C. Freire, J. Pijoan, S. Maragall, J. Monteagudo, A. Ordinas, J. C. Reverter. Pharmacogenetics of acenocoumarol: cytochrome P450 CYP2C9 polymorphisms influence dose requirements and stability of anticoagulation. *Haematologica* 2002, 87, 1185-1191.

TWO-DIMENSIONAL GEL ELECTROPHORESIS AND MALDI-TOF MS ANALYSIS OF THERAPEUTIC RECOMBINANT MONOCLONAL ANTIBODIES AND FUSION PROTEINS

Dashnor Nebija¹, Pranvera Breznica², Arlinda Daka², Christian R. Noe¹ and Bodo Lachmann¹

¹Department of Medicinal Chemistry, University of Vienna, Althanstrasse 14, A-1090 Vienna, Austria

²Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Pristina, Q.K.U., p.n. 10000 Pristina, Kosovo

The main objective of the presented study is the evaluation of two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) in combination with matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-TOF MS) after tryptic digest with regard to suitability for qualitative

characterization and identification of humanized and chimeric recombinant monoclonal antibodies (rmAbs) trastuzumab and rituximab and fusion protein abatacept. Moreover, the impact of post-translational modification of these proteins on the electrophoretic behavior should be evaluated.

Trastuzumab (rhuMAB HER2) is a humanized IgG1 rmAb isolated from a mammalian cell line (Chinese hamster ovary, CHO) by continuous perfusion. It is indicated for the treatment of patients with metastatic breast cancer whose tumors overexpress HER2 [1]. Rituximab is a genetically engineered chimeric mouse/human rmAb representing a glycosylated immunoglobulin with human IgG1 constant regions and murine light-chain and heavy chain variable region sequences. The antibody is produced by CHO cell suspension culture. Rituximab is indicated for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma and rheumatoid arthritis [2]. Abatacept (CTLA4-Ig) is a fusion protein produced by rDNA technology in CHO cells that consists of the extracellular domain of human cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 linked to a modified Fc portion of human immunoglobulin G1. Abatacept is indicated for the treatment of rheumatoid arthritis [3]. In this study, one-dimensional SDS-PAGE and 2-DE electrophoresis in reducing and nonreducing conditions were used for the assessment of molecular weight and optimization of the deglycosylation procedure. In addition, isoelectric points (*pI*) have been determined by 2-DE. The applied 2-DE method was optimized for the *pI* gradient (IPG strips 3-6 L, 4-7 L, 6-9 L and 3-11 NL), gel concentration and visualization procedure. Sensitivity and linearity were assessed, as well. One dimensional SDS-PAGE revealed that, in reducing conditions, both rmAbs are resolved in two distinct *Mr* species which migrated in two bands confirming the migration behavior typical for IgG antibodies which are composed of two identical subunits each composed by two polypeptide chains: two heavy and two light chains. Under these electrophoresis conditions, reduced form of abatacept migrated as a single sharp band. For both rmAbs, 2-DE gels revealed characteristic glycoprotein migration behavior resulting in highly complex, band formed typical spot patterns with small differences in molecular weight, but different *pIs*. On the other hand, 2-DE analysis revealed that, abatacept, is very complex mixture of different isoforms, more than 14 spots could be detected with estimated *pI* range 4.5-5.5.

Enzymatic deglycosylation and charge heterogeneity were studied with SDS-PAGE and 2-DE. N-linked oligosaccharides were released with N-glycosidase F. Neuraminidase (sialidase) was used for the cleavage of sialic acids, O-Glycosidase for release of O-linked glycans and Carboxypeptidase B was used for the study of lysine truncation.

For the identification/primary sequence confirmation, experimentally determined peptide masses, obtained from MALDI-TOF MS analysis of in gel trypsin digested abatacept, trastuzumab and rituximab are compared with calculated peptide masses, by applying the enzyme cleavage rules, from three primary sequence databases: MSDB, NCBItr and SwissProt using MASCOT and PROWL search engines [4,5]. PeptideMass program was used to *in silico* cleave entered abatacept sequence with trypsin and to compute generated peptide masses with their specified modifications [6]. Antibody concentration, staining procedure, amount of trypsin, digestion time, extraction of generated peptides and other factors related to the MALDI-TOF sample preparation and presentation have been studied and optimized. Trastuzumab, rituximab and abatacept were identified from their respective gel spots. Peptide mass fingerprinting analysis allowed rapid identity confirmation of studied medicinal products.

REFERENCES

1. D.J. Slamon, W. Godolphin, L.A. Jones, J.A. Holt, S.G. Wong, D.E. Keith, W.J. Levin, S.G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich, and M.F. Press, Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer, *Science*. 244 (1989), pp. 707-712.
2. M.E. Reff, K. Carner, K.S. Chambers, P.C. Chinn, J.E. Leonard, R. Raab, R.A. Newman, N. Hanna, D.R. Anderson, Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody, *Blood* 83 (2) (1994), pp. 435-445.
3. P.S. Linsley, J.A. Ledbetter, N.K. Damle and W. Brady: CTLA4 Ig fusion proteins. United States Patent. December. 01. 1998. U.S. Patent No. 5,844,095. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. Available from: <http://patft.uspto.gov/>, last accessed: 18.08.2010
4. D.N. Perkins, D.J.C. Pappin, D.M. Creasy, J.S. Cottrell, Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data, *Electrophoresis* 20(18) (1999), pp. 3551-67.
5. <http://prowl.rockefeller.edu/prowl/cgi/profound.exe>. Last accessed: 18.08.2010.
6. <http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html>, Last accessed: 12.08.2010.

GENETIC PROFILE OF CYP2C19
POLYMORPHISMS IN POPULATION
FROM REPUBLIC OF MACEDONIA

Aleksandra Kapedanovska Nestorovska¹,
Aleksandra Dimitrovska Cvetkovska²,
Ljubica Suturkova¹

¹ Faculty of Pharmacy, University of Ss Cyril and Methodius, Skopje, R.Macedonia,

² Special Hospital for Surgery Diseases "Filip II", Skopje, R.Macedonia

BACKGROUND

Genetic polymorphisms in CYP2C19 drug- metabolizing enzymes have become a subject of extensive studies concerning clinically important variation in the individual response to clopidogrel therapy (1). Pharmacogenetic testing for these variants is extremely dependent on a particular country/population genetic architecture (2).

AIM

To evaluate the frequencies of four CYP2C19 polymorphisms, examine the possibility for prediction of CYP2C19 clopidogrel metabolic phenotypes in our population and to compare obtained results with the data of other populations.

MATERIALS AND METHODS

The study group consisted of 198 subjects of the general population recruited from Special Hospital for Surgery Diseases "Filip II". Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using QIAGEN DNA extraction kit according to the manufacture instruction procedure (QIAGEN AS, Oslo, Norway). The CYP2C19 genotypes for the CYP2C19*2 (c.G681A; rs4244285), CYP2C19*3 (c.G636A; rs4986893), CYP2C19*4 (c.A1G; rs28399504) and CYP2C19*5 (c.C1297T; rs56337013) polymorphisms were detected by Real-Time PCR method, using TaqMan SNP genotyping assay according to the manufacturer instructions. Regarding the CYP2C19 predicted metabolic phenotypes, individuals were stratified into three distinct phenotype groups: extensive metabolizer (EM: homozygous for the wild-type CYP2C19 allele), intermediate metabolizer (IM: heterozygous genotype for the loss-of-function CYP2C19 allele) and poor metabolizer (PM: homozygous for the loss-of-function CYP2C19 alleles) phenotype.

RESULTS AND DISCUSSION

Of the 198 subjects (mean age 60,57± 8,49 years) included in the study, 127 (64,14% were male and 71 (35,85%) were female. All the participants were of Caucasian origin. The population frequencies of CYP2C19 *2; *3 and *4 loss of function alleles, responsible for impaired clopidogrel metabolism were 18.69; 0.51 and 0.51, respectively. The CYP2C19*5 loss of function allele was not detected.

Results showing genotype distribution of subjects homozygous for the wild type allele (wt/wt), compared to patients heterozygous for the loss of function allele (wt/mut) and patients homozygous for the loss of function allele (mut/mut), regarding all CYP2C19 polymorphisms, are presented in Table 1. All the observed genotype distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium. The prevalence of CYP2C19 metabolic phenotypes in population from R.M is presented in Table2.

Among the CYP2C19 alleles, *2 is the most common (ranging from 9-26%) in Caucasians; *3 is relatively rare (0-2%) and the frequency of *4 is 0.6%. The CYP2C19*2 and *3 variants account for approximately 83% of all PM alleles and are responsible for about 90% PM phenotypes in Caucasians (3,4). Numerous studies that have been done to establish the frequency of the CYP2C19 polymorphisms have proved the ethnic specificity of these genetic variants, resulting in significantly different prevalence of the predicted metabolic phenotypes among different world-wide populations.

Table 1. Genotype distribution and allelic frequencies of CYP2C19 genetic variants in study population from R.M

CYP2C19 Polymorphisms* (N=198)		No. subjects	frequencies
CYP2C19*2 [rs4244285]	wt/wt	133	67.17
	wt/mut	56	28.28
	mut/mut	9	4.55
	wt allele	322	81.31
	mut allele	74	18.69
CYP2C19*3 [rs4244285]	wt/wt	196	98.99
	wt/mut	2	1.01
	mut/mut	0	0
	wt allele	394	99.49
	mut allele	2	0.51
CYP2C19*4 [rs4244285]	wt/wt	196	98.99
	wt/mut	2	1.01
	mut/mut	0	0
	wt allele	394	99.49
	mut allele	2	0.51

* wt/wt – homozygous wild type; wt/mut – heterozygous mutant; mut/mut – homozygous mutant

Table 2. Prevalence of CYP2C19 metabolic phenotypes in population from R.M

CYP2C19 metabolic phenotypes*	No. subjects	frequencies
EM (wt/wt)	129	65.15
IM (wt/mut)	60	30.30
PM (mut/mut)	9	4.55
wt allele	318	80.30
mut allele	78	19.70

*EM-extensive; IM-intermediate; PM-poor metabolizer

A comparison of the distribution of the two most common CYP2C19 loss of function alleles among the Macedonian subjects and different ethnic groups reported in the literature (3,4,5), is presented in Table 3.

Table 3. Distribution of CYP2C19 variant alleles among different ethnic groups

Caucasians		CYP2C19 polymorphisms	
Population	N	*2	*3
Australian	227	35.5	14.3
Macedonian	198	18.7	0.5
Danish	239	16	0
German	328	15.9	0.2
Croatian	200	15.0	0
Swedish	83	14.4	0.7
Romania	200	13.7	0
Dutch	765	13.3	0.2
Portugal	153	13	0
Turkish	404	12	0.4
Italian	360	11.1	0
Russian	290	11.4	0.3
Belgian	121	9.1	0

CONCLUSION

The frequencies of CYP2C19 allelic variants in our population are similar to that found in other Caucasian populations. We estimate a PM phenotype frequency of approximately 4,55% in the Macedonian population taking as a result of only CYP2C19*2 genetic polymorphism. Using our results we plan to develop a program for individualization of clopidogrel therapy in R.Macedonia.

REFERENCES

1. Angiolillo, D.J., Fernandez-Ortiz, A., Bernardo, E., Alfonso, F., Macaya, C., Bass, T.A., Costa, M.A. (2007), Variability in individual responsiveness to clopidogrel. Clinical implications, management, and future perspectives. *J Am Coll Cardiol* . 49:1505-16.
2. Božina, N., Granic, P., Lalic, Z., Tramisak, I., Lovric, M., Rukavina, A.(2003), Genetic polymorphisms of Cytochrom P450:CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in Croatian population. *Croatian Medical Journal*. 44 (4) 425-428
3. Rosemary, J and Adithan, C. (2007) , The Pharmacogenetics of CYP2C9 and CYP2C19: Ethnic Variation and Clinical Significance. *Current Clinical Pharmacology*. 2: 93-109
4. Mega, J.L., Close, S.L., Wiviott, S.D., Shen, L., Hockett, R.D., Brandt, J.T., Walker, J.R., Antman, E.M., Macias, W., Braunwald, E., Sabatine, M.S. (2009), Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med*. 360(4):354-62.
5. Buzoianu, A.D., Trifa, A.P., Popp, R.A., et al. (2010). Screening for Cyp2C19*2,*3 and *4 gene variants in a Romanian population study group. *FARMACIA*. 58(6): 806-81.

ГЕНЕТСКИ ПРОФИЛ НА CYP2C19 ПОЛИМОРФИЗМИ ВО ПОПУЛАЦИЈА ОД РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

А. Капедановска Несторовска¹, А. Димитровска Цветковска², Љ.Шутуркова¹

¹Фармацевтски Факултет, Универзитет, "Св.Кирил и Методиј"-Скопје,
²Специјална Болница за Хируршки Болести"Филип II"-Скопје, Р.Македонија

ВОВЕД

Генетските полиморфизми на CYP2C19 лек - метаболизирачките ензими, од неодамна претставуваат предмет на екстензивни истражувања од аспект на асоцијација со клинички значајната варијабилност во индивидуалниот одговор на терапијата со клопидогрел¹. Голем број на студии во кои се определува фреквенцијата на CYP2C19 полиморфизмите во различни популации, посочуваат на

етнички зависна специфичност на овие генетски варијанти, што резултира со значајно различна преваленца на дефинираните метаболни фенотипови во различните популации во светот².

ЦЕЛ

Определување на фреквенцијата на сет на CYP2C19 (*2, *3, *4 и *5) еднонуклеотидни полиморфизми (single nucleotide polymorphisms-SNP), утврдување на преваленцата на CYP2C19 дефинираните, клопидогрел асоцирани, метаболички фенотипови во нашата популација и споредба на добиените резултати со резултатите од студиите кај другите популации.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Како студиска група за определување на фреквенцијата на CYP2C19 генетските варијации во општата популација беа користени 198 ДНА примероци на испитаници регрутирани од Специјалната болница за Хируршки болести "Филип II" во Скопје. Геномската ДНА беше изолирана од периферна полна крв со употреба на QIAGEN кит за екстракција на ДНА според упатствата дадени од производителот (QIAGEN AS, Oslo, Norway). Генотипизацијата на CYP2C19*2 (c.G681A; rs4244285), CYP2C19*3 (c.G636A; rs4986893), CYP2C19*4 (c.A1G; rs28399504) и CYP2C19*5 (c.C1297T; rs56337013) полиморфизми, беше извршена со примена на Real-Time PCR методот (MxPro 3005P, Stratagene, La Jolla, CA, USA) и употреба на TaqMan SNP специфични тестови за генотипизација, според упатствата на производителот (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Испитаниците, врз основа CYP2C19 дефинираните метаболички фенотипови, беа стратифицирани во три различни групи: брзи метаболизери (БМ: хомозиготи за нормален CYP2C19 алел), средно брзи метаболизери (СБМ: хетерозиготи за варијантен CYP2C19 алел) и спори метаболизери (СМ: хомозиготи за варијантен CYP2C19 алел).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Сите 198 испитаници (127 машки (64,14%) и 71 женски (35,85%); средна возраст 60,57± 8,49 години), кои се вклучени во студијата беа од бела раса. Популационите фреквенции на CYP2C19 *2; *3 и *4 варијантните алели, одговорни за пореметувања во нормалниот метаболизам на клопидогрелот изнесуваат: 18.69; 0.51 и 0.51, соодветно. При генотипизацијата на студискиот примерок не беше детектиран CYP2C19*5 варијантниот алел, заради што овој полиморфизам не е вклучен во понатамошните анализи. Генотипската дистрибуција и алелната фреквенција на останатите анализирани CYP2C19 полиморфизми е прикажана на Табела 1. Утврдените генотипски дистрибуции за сите полиморфни варијанти се во рамките на прифатливите отстапувања според Hardy – Weinberg equilibrium тестот. Преваленцата на CYP2C19 метаболичките фенотипови, дефинирани врз основа на CYP2C19*2,*3 и *4 полиморфизмите, во Република Македонија, е претставена на Табела 2.

Табела 1. Генотипска дистрибуција и алелна фреквенција на CYP2C19 генетските варијанти во Р.Македонија.

CYP2C19 Polymorphisms* (N=198)	No. subjects	frequencies	
CYP2C19*2 [rs4244285]	wt/wt	133	67.17
	wt/mut	56	28.28
	mut/mut	9	4.55
	wt allele	322	81.31
CYP2C19*3 [rs4244285]	wt/wt	196	98.99
	wt/mut	2	1.01
	mut/mut	0	0
	wt allele	394	99.49
CYP2C19*4 [rs4244285]	wt/wt	196	98.99
	wt/mut	2	1.01
	mut/mut	0	0
	wt allele	394	99.49
mut allele		2	0.51

* wt/wt – хомозигот на нормален алел; wt/mut – хетерозигот за варијантен алел; mut/mut – хомозигот на мутантен алел; wt-нормален, mut-мутантен алел

Генетската варијанта на CYP2C19*2 е најзастапена (варијации во интервал 9-26%) кај белата популација; *3 е релативно ретка (0-2%), додека пак фреквенцијата на *4 изнесува 0.6%. Генетските варијанти на CYP2C19*2 и *3 сочинуваат приближно 83% од сите CM алеле и се одговорни за околу 90% CM фенотиповите кај белата раса^{3,4}. На Табела 3 е прикажана дистрибуцијата на CYP2C19*2 и *3 кај испитаниците од Р.Македонија во споредба со литературните податоци за дистрибуцијата кај другите етнички групи од светот^{3,4,5}.

ЗАКЛУЧОК

Фреквенциите на CYP2C19 варијантните алели во нашата популација се слични со оние кај останатите популации од белата раса. Фреквенцијата на CM фенотип во Р.Македонија изнесува 4.55%, дефинирано врз основа само на CYP2C19*2 генетскиот полиморфизам. Овие резултати имаат за цел да придонесат во истражувањата за индивидуализација на терапијата со клопидогрел во нашата држава.

Табела 2. Преваленца на CYP2C19 дефинираните метаболните фенотипи во популација од Р.Македонија

CYP2C19 Метаболни фенотипи*	n	фреквенција
EM (wt/wt)	129	65.15
CEM (wt/mut)	60	30.30
CM (mut/mut)	9	4.55
wt алел	318	80.30
mut алел	78	19.70

Табела 3. Дистрибуција на CYP2C19*2 и *3 варијантните алели во различни етнички популации од белата раса

Бела раса		CYP2C19 полиморфизми		
популација	N	*2	*3	
Australian	227	35.5	14.3	
Macedonian	198	18.7	0.5	
Darwish	239	16	0	
German	328	15.9	0.2	
Croatian	200	15.0	0	
Swedish	83	14.4	0.7	
Romania	200	13.7	0	
Dutch	765	13.3	0.2	
Portugal	153	13	0	
Turkish	404	12	0.4	
Italian	360	11.1	0	
Russian	290	11.4	0.3	
Belgian	121	9.1	0	

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. Angiolillo, D.J., Fernandez-Ortiz, A., Bernardo, E., *et al.* (2007), Variability in individual responsiveness to clopidogrel. Clinical implications, management, and future perspectives. *J Am Coll Cardiol.* 49:1505-16.
2. Bozina, N., Granic, P., Lalic, Z., *et al.* (2003), Genetic polymorphisms of Cytochrom P450:CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in Croatian population. *Croatian Medical Journal.* 44 (4) 425-428
3. Rosemary, J and Adithan, C. (2007), The Pharmacogenetics of CYP2C9 and CYP2C19: Ethnic Variation and Clinical Significance. *Current Clinical Pharmacology.* 2: 93-109
4. Mega, J.L., Close, S.L., Wiviott, S.D., *et al.* (2009), Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med.* 360(4):354-62.
5. Buzoianu, A.D., Trifa, A.P., Popp, R.A., *et al.* (2010), Screening for Cyp2C19*2,*3 and *4 gene variants in a Romanian population study group. *FARMACIA.* 58(6): 806-817

THYMIDYLATE SYNTHASE ENHANCER REGION (TSER) 2R/3R POLYMORPHISMS AS AN INDEPENDENT RISK FACTOR FOR COLORECTAL CANCER IN MACEDONIAN POPULATION

Kapedanovska Nestorovska A¹, Serafimoska Z¹, Sterjev Z¹, Josifovski T², Petrushevska N³, Suturkova L¹, Dimovski A J¹

¹Center for Bimolecular Pharmaceutical Analysis, Faculty of Pharmacy,

²Clinic for Abdominal Surgery,

³Institute of Radiotherapy and Oncology, Faculty of Medicine, University "Ss Cyril and Methodius", Skopje, Republic of Macedonia

BACKGROUND

Thymidylate synthase (TYMS) is a key enzyme in folate metabolism, an important pathway in carcinogenesis. TYMS catalyzes the conversion of dUMP to dTMP, an essential nucleotide needed for DNA synthesis and repair¹. The TYMS gene has a variable number of tandem repeats (VNTR; 2R or 3R) polymorphisms in the thymidylate synthase enhancer region (TSER), a G/C single nucleotide polymorphism within the second repeat sequence of 3R (3G or 3C), and a 6 bp insertion/deletion polymorphism (6 bp or 0 bp) in the TYMS 3'-untranslated region (3'-UTR)². Although the protective effect of the TYMS TSER tandem repeat polymorphism in colon cancer chemotherapy has been well

studied, the association between TSER polymorphisms and risk for colorectal cancer has remained elusive³⁻⁵.

AIM

To investigate whether TYMS TSER 2R/3R independently predicts risk of CRC in a population based case-control study.

MATERIALS AND METHODS

The case group consisted of 327 patients with clinopatologically confirmed CRC (178 male and 144 female; mean age 60, 27 ± 11, 08). The control group was composed of 105 blood donors (40 male and 65 female; mean age 74.52 ± 10.46). Genomic DNA was obtained from peripheral blood or tumor using Proteinase K digestion/phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation.

The TYMS TSER polymorphism was analyzed by polymerase chain reaction (PCR) using a forward (5'- TCC GAG CCG GCC ACA GGC AT-3') and a reverse (5'-GCC GAA GGG GTC CTG CCA-3') primer. The genotypes were evaluated by electrophoresis on a 10% ethidium bromide-stained polyacrylamide gel (PAGE). Fragments of 109 and 137 bp corresponded to the 2R and 3R allele, respectively (Fig. 1).

Hardy-Weinberg equilibrium was tested with the X2 statistic for the goodness-of-fit (1 df). Univariate analysis was performed for age, (<50 vs ≥50 years, <60 vs ≥60 years,) gender, tumor location (right sided vs left sided), TNM (I + II vs III+IV) stages of the tumor in patients and controls, stratified by the genotypes of the TYMS gene. The statistical significance of the differences between groups was calculated by the chi-square and Fischer exact test. Odds ratios (ORs) were calculated and were given within 95% confidence intervals (CI). Factors with p <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Among the 327 patients and 105 controls, the TYMS TSER *3R allele frequencies were 0.54 and 0.63 respectively, and TSER *2R allele frequencies were 0.44 and 0.38, respectively. The TYMS TSER genotype frequencies within the patients and control groups are presented in Table 1. Both study groups were in Hardy-Weinberg equilibrium for the distribution of the TYMS TSER 2R/3R polymorphism.

Compared with 3R/3R genotype, patients with TYMS 2R/2R genotype had significantly increased risk of CRC (p=0.046) with adjusted relative risk of 2.009 (95% C.I. =1.004-4.022). Additionally, the TYMS TSER * 3R allele was associated with lower risk of CRC in a co-dominant [2R/2R vs. 3R/3R, (p=0.046) and 2R/2R vs. 2R/3R (p=0.032)] and dominant [2R/2R vs. 2R/3R+3R/3R, (p=0.0264)] model of statistical analysis (Table1). No significant differences in frequencies of the TYMS TSER genotypes were found in CRC patients stratified by the clinicopathologic variables (age, gender, tumor stage or localization). In contrast with the findings for CRC, reporting no association or statistically significant association of 3R/3R genotype and increased risk of CRC, the results from our study are consistent with studies reporting association with acute lymphocyte leukemia and malignant lymphoma, and lung cancer³⁻⁵.

Since TS *2R allele is related to lower plasma folate levels, and since high folate levels reduce DNA damage or facilitate DNA repair, then it is expected that 2R/2R genotype would be associated with an increased risk of cancer.

CONCLUSION

To the best of our knowledge, the present case-control study is the first one to report an association between TYMS 2R/2R genotype and increased risk of colorectal cancer. The results of this study suggest

that the effect of the TSER polymorphism and folate pathway on colorectal cancer may be specific to Macedonian ethnic group.

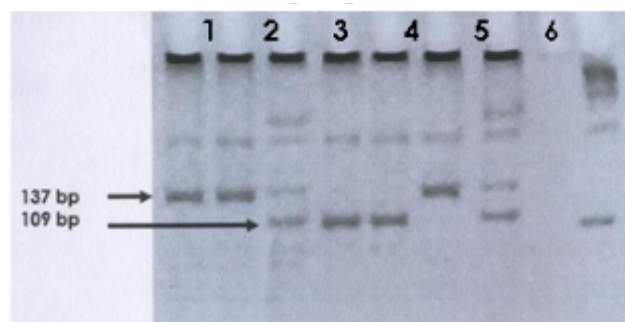


Fig.1. PAGE electrophoresis following PCR amplification of the TYMS TSER 2R/3R polymorphism: 1, 2, 6-3R/3R genotype; 3,7-2R/3R genotype; 4,5-2R/2R genotype; 8-blank; M-50bp DNA ladder

Table 1. Association of TYMS TSER 2R/3R polymorphism with CRC risk in Macedonian population

TYMS TSER polymorphism	Patients n (%)	Controls n (%)	OR (95% CI)	p value
Genotypes				
2R/2R ^a	73 0.22	13 0.13	2.009 (1.004-4.022)	0.046
2R/3R ^b	145 0.44	53 0.50	0.487 (0.250-0.951)	0.032
3R/3R ^b	109 0.33	39 0.37	0.498 (0.249-0.996)	0.046
2R/2R	73 0.22	13 0.12	1.00 (ref.)	
2R/3R + 3R/3R	254 0.78	92 0.83	0.492 (0.260-0.929)	0.0264
Alleles				
2R allele	291 0.44	79 0.38	1.329 (0.966-1.829)	0.079
3R allele	363 0.56	131 0.62	1.00 (ref.)	

Abbreviations: a- 3R/3R as reference; b-2R/2R as reference

REFERENCES

- Chen,J., Hunter,D.J., Stampfer,M.J., Kyte,C., Chan,W., Wetmur,J.G., Mosig,R., Selhub,J. and Ma,J. (2003) Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region modifies the risk and survival of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 12, 958-962.
- Curtin, K., Ulrich, C.M., Samowitz, W.S., Bigler,J., Caan,B., John D. Potter.J.D., Slattery,M. (2007) Thymidylate synthase polymorphisms and colon cancer: Associations with tumor stage, tumor characteristics and survival. *Int. J. Cancer.*, 120, 2226-2232.
- Shi,Q., Zhang, Z., Neumann,A.S., Li,G., Margaret R.Spitz,M.R., Wei,Q. (2005) Case-control analysis of thymidylate synthase polymorphisms and risk of lung cancer. *Carcinogenesis*, 26 (3),649-656,
- Jensen,S.A., Ben Vainer,B., Jens Benn Swensen,J.B. (2006) The prognostic significance of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal cancer of 303 patients adjuvantly treated with 5-fluorouracil. *Int. J. Cancer.*, 120, 694-701
- Skibola,C.F., Smith,M.T., Hubbard,A. et al. (2002) Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood*, 99, 3786-3791.

ТИМИДИЛАТ СИНТЕТАЗА (2R/3R) ГЕНЕТСКА ВАРИЈАНТА КАКО НЕЗАВИСЕН РИЗИК ФАКТОР ЗА РАЗВОЈ НА КОЛОРЕКТАЛЕН КАРЦИНОМ ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

Капедановска Несторовска А¹, Серафимоска З¹,
Стерјев З¹, Јосифовски Т², Петрушевска Н³,
Шутуркова Љ¹, Димовски А.Ј.¹

¹Центар за Биомолекуларни Фармацевтски Анализи,
Фармацевтски Факултет,

²Клиника за Дигестивна Хирургија,

³Институт за Радиотерапија и Онкологија, Медицински Факултет,
Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје, Република Македонија

ВОВЕД

Тимидилат синтетаза (TYMS) е најзначајниот ензим во фолатниот метаболизам кој претставува еден од клучните чекори во процесот на канцерогенеза. Тој ја катализира биосинтезата на тимидин монофосфат (dTMP), нуклеотид потребен за синтеза и репарација на ДНА молекулата¹. Досега се идентификувани три полиморфизми на TYMS генот: 2R/3R полиморфизам на 28 bp тандем повторувачки секвенци во промотер регионот (TSER 2R/3R), G/C еднонуклеотиден полиморфизам во втората од трите повторувачки секвенци на 3R (3G/3C) и полиморфизам на инсерција/делеција на 6 bp (6 bp / 0 bp) во TYMS 3'-нетранслациониот регион (3'-UTR)². Асоцијацијата помеѓу TSER полиморфизмот и хемотераписката ефикасноста при третман на колоректален карцином (КПК) е потврдена во голем број студии, но сепуште не постојат јасни докази во однос на корелацијата помеѓу TSER полиморфизмот и ризикот за развој на КПК³⁻⁵.

ЦЕЛ

Определување на влијанието на TYMS TSER (2R/3R) полиморфизмот како независен предиктивен фактор за развој на КПК во Р.Македонија.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Студиската група во оваа популација-базирана студија на случај-контрола ја сочинуваат 327 пациенти со клиничко патолошки потврден КПК (178 мажи и 144 жени, средна возраст 60, 27 ± 11, 08), додека пак контролната група е сочинета од 105 здрави доброволци (40 мажи и 65 жени; возраст 74.52 ± 10.46) без историја на малигна болест. Како материјал за анализа беше користена ДНА изолирана од периферна крв или туморско ткиво добиено после хируршката интервенција, со примена на класичен метод на протеиназа К дигестија, фенол-хлороформ екстракција и преципитација со етанол. За генотипизацијата на TYMS TSER полиморфизмот беше користен методот на амплификација со полимераза верижна реакција (Polymerase Chain Reaction-PCR) и олигонуклеотидни прајмери чија нуклеотидната секвенца е следна: за директниот (5'-TCC GAG CCG GCC ACA GGC AT-3'), за реверзниот (5'-GCC GAA GGG GTC CTG CCA-3'). Добиените PCR амплифицираните ДНА фрагменти беа анализирани после електрофоретско разделување на 10% етидиум-бромид обоен полиакриламиден гел (PAGE електрофореза). Алелната фреквенција и генотипската дистрибуција на TYMS TSER полиморфизмот кај двете студиски групи беа евалуирани со Hardy-Weinberg equilibrium тестот. Со примена на униваријантна анализа беше утврдена кор-

лацијата помеѓу возраста (<50 vs. ≥50 години, <60 vs. ≥60 години,) полот, локализацијата на туморот (десно vs. лево локализиран), TNM статусот (I + II vs. III+IV) на туморот кај пациентите и контролите, стратифицирани врз основа на TYMS генотипот. Ризикот за појава на КПК, дефиниран како Odds ratio (OR) и соодветните граници на сигурност (95% C.I.) беа определени со примена на chi-square и Fischer-овиот тест за значајност. За статистички значајни резултати се сметаа оние со $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Добиените резултати и споредбата на алелните фреквенции и генотипската дистрибуција на TYMS TSER (2R/3R) полиморфизмот помеѓу 327 пациенти и 105 контролни испитаници се прикажани во Табела 1. Генотипските дистрибуции за двете студиски групи беа во рамките на прифатливите отстапувања според Hardy - Weinberg equilibrium тестот. Статистичката анализа на резултатите укажува на значајна асоцијација помеѓу TYMS 2R/2R и зголемиот ризик за развој на КПК (OR=2.009, 95% C.I. =1.004-4.022; $p=0.046$). Дополнително, TYMS TSER * 3R алелот беше асоциран со помал ризик за појава на КПК во ко-доминантниот [2R/2R vs. 3R/3R, ($p=0.046$) и 2R/2R vs. 2R/3R ($p=0.032$)] и во доминантниот [2R/2R vs. 2R/3R+3R/3R, ($p=0.0264$)] модел на статистичка анализа. Не е утврдена статистички значајна корелација помеѓу ризикот за развој на КПК и пациентите стратифицирани според дефинираните клиничко-патолошки карактеристики. Резултатите од оваа студија се спротивни на веќе објавените за КПК, но се во согласност со студиите кои посочуваат на асоцијација на 2R/2R генотипот и ризикот за развој на акутна лимфоцитна леукемија (АЛЛ), малигна лимфома и карцином на бели дробови³⁻⁵. Фактот дека ниските фолат-плазматски концентрации, кои ја зголемуваат веројатноста за ДНА оштетување и го инхибираат процесот на ДНА репарацијата, се асоцирани со TYMS *2R алелот, ја објаснуваат можната поврзаноста на 2R/2R генотипот и зголемиот ризик за развој на КПК.

ЗАКЛУЧОК

Пациентите кои се носители на 2R/2R генотипот имаат значајно зголемен ризик за развој на КПК во споредба со оние кои се носители на 3R/3R генотипот. Според нашите литературни сознанија, ова претставува прва студија на во која се укажува на асоцијација помеѓу TYMS 2R/2R генотипот и зголемиот ризик за појава на КПК. Овие резултати посочуваат на популационо-специфичен ефект на TYMS TSER полиморфизмот и фолатниот метаболизам во развојот на КПК во Република Македонија.

Табела 1. Ризик за појава на КРК асоциран со TSER 2R/3R полиморфизмот на TYMS генот во популација од Р. Македонија

TYMS полиморфизам	TSER	Пациенти n (%)	Контроли n (%)	OR (95% CI)	p value		
Генотип							
2R/2R ^a		73	0.22	13	0.13	2.009 (1.004-4.022)	0.046
2R/3R ^a		145	0.44	53	0.50	0.487 (0.250-0.951)	0.032
3R/3R ^a		109	0.33	39	0.37	0.498 (0.249-0.996)	0.046
2R/2R		73	0.22	13	0.12	1.00 (ref.)	
2R/3R + 3R/3R		254	0.78	92	0.83	0.492 (0.260-0.929)	0.0264
Алиел							
2R алел		291	0.44	79	0.38	1.329 (0.966-1.829)	0.079
3R алел		363	0.56	131	0.62	1.00 (ref.)	

Ознаки: а- 3R/3R како референт за споредба ; б-2R/2R како референт за споредба

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. Chen, J., Hunter, D. J., Stampfer, M. J., Kyte, C., Chan, W., Wetmur, J. G., Mosig, R., Selhub, J. and Ma, J. (2003) Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region modifies the risk and survival of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 12, 958-962.
2. Curtin, K., Ulrich, C. M., Samowitz, W. S., Bigler, J., Caan, B., John D. Potter, J. D., Slattery, M. (2007) Thymidylate synthase polymorphisms and colon cancer: Associations with tumor stage, tumor characteristics and survival. *Int. J. Cancer.*, 120, 2226-2232.
3. Shi, Q., Zhang, Z., Neumann, A. S., Li, G., Margaret R. Spitz, M. R., Wei, Q. (2005) Case-control analysis of thymidylate synthase polymorphisms and risk of lung cancer. *Carcinogenesis*, 26 (3), 649-656.
4. Jensen, S. A., Ben Vainer, B., Jens Benn Swensen, J. B. (2006) The prognostic significance of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal cancer of 303 patients adjuvantly treated with 5-fluorouracil. *Int. J. Cancer.*, 120, 694-701
5. Skibola, C. F., Smith, M. T., Hubbard, A. et al. (2002) Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood*, 99, 3786-3791.



АКАДЕМСКА СЕКЦИЈА
орални презентации

ACADEMIC SECTION
oral presentations

PHARMINE - PHARMACY EDUCATION IN EUROPE

Jeffrey Atkinson¹ and Bart Rombaut²,

¹Pharmacolor Consultants Nancy, Villers, France

²School of Pharmacy, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium.

Pharmacy education and training (PET) faces the challenge of maintaining a polyvalent, pharmacy diploma based on a 5-year period of education and training within the context of:

- » Evolution in the organisation and use of public health resources within an increasingly difficult economic situation
- » Rapidly developing changes in the EU pharmaceutical and biotechnological industries
- » The implementation of the Bologna philosophy and especially the application of the 3+2+3 years B+M+D system
- » The need to tune PET in the different member states for free movement in a profession that is sectorally regulated by an EU directive 2005/36, and the need to develop a position for the revision of this directive in 2012/3.

The consortium centred around 4 EU universities with solid international reputations in the teaching and training of pharmacists:

- » Brussels VUB Pharmacy Faculty
- » Nancy Pharmacy Faculty
- » London School of Pharmacy
- » Lisbon Pharmacy Faculty

These were supported by the main EU groups dealing with pharmaceutical affairs:

- » the pharmacy students union (EPSA)
- » the pharmaceutical group of the EU (PGEU, representing community pharmacists),
- » the hospital (EAHP) pharmacist group
- » the industrial (EIPG) pharmacist group

The 14 associated partners included at the offset represent professional pharmacy organisations in Europe and in the USA and other universities with a wide range of experience in culturally and linguistically diverse areas of Europe. This number was increased to 23 associated partners by the end of the project, essentially with the incorporation of Eastern European partners in provision of the PHARM-EE TEMPUS bid.

The coordinator of the consortium was Bart Rombaut from VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL, Brussels. The consortium was run by the SME PHARMACOLOR CONSULTANTS NANCY (executive director: Jeffrey Atkinson).

PHARMINE (<http://www.pharmine.org>):

- » Identified pharmacy faculties within Europe and produced a databank
- » Evaluated how faculties are adapting to the 4 exigencies above
- » Produced a recommendations for a European model for PET

The consortium worked in three phases:

1. A survey of the existing state of pharmacy education and training in the Europe with
 - a. A study of similarities and differences
 - i. How education and training conforms with the EU directive on the sectoral profession of pharmacy
 - ii. How the Bologna philosophy has affected education and training so far.
 - iii. Summary position papers will be produced for use in the TEMPUS project PHARM-EE on the extension of PHARMINE principles to Eastern Europe
2. Reflection and discussion on pharmacy competency core curriculum
3. Dissemination to stakeholders
4. Reflexion on the creation of an accreditation scheme (this will be part of the future bid: PHARM-QA "Quality Assurance in Pharmacy")

PHARMINE worked in collaboration with MEDINE-2 (<http://medine2.com/>) – the EU-funded consortium that deals with similar problems in another healthcare sectoral profession that it is regulated by the same EU directive – medicine. A combined PHARMINE-2 / MEDINE-2 strategy is being developed.

HARMONIZATION AND REFORMATION OF THE MASTER IN PHARMACY STUDY PROGRAMME AT THE FACULTY OF PHARMACY, UNIVERSITY OF LJUBLJANA

Irena Mlinarič-Raščan, Mirjana Gašperlin, Borut Božič

Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Slovenia

Master in Pharmacy study programme have in recent years undergone harmonization and reformation processes. Some of those were initiated as the accession requirements in negation of EU membership. Slovenia became a member of the EU on 1 May 2004 and has undertaken also the process of harmonization of the study and the regulation of the pharmacist profession. The Faculty of Pharmacy had harmonized the study programme in Pharmacy in compliance with the requirements of the directive 2005/36/EC (formerly 85/432/EEC). The major difference with the previous curricula is the extension of program from 9 to 10 semesters, which is due to the inclusion of a 6-month practical training in the curriculum, and substitutes the pre-existing traineeship. Other changes included extension of elective subjects.

Following many discussions in recent years, we came to a uniform decision that the only acceptable model of study for the pharmacist profession with qualifications in the EU is 5 + 0, corresponding to 300 ECTS, which enables direct enrolment in doctoral study. In 2007, the programme was checked and accredited by the Council for Higher Education as the Uniform master's study programme in Pharmacy, and the Faculty of Pharmacy launched the first-time enrolment procedure in the academic year 2008/09. The programme is balanced in phar-

maceutical, natural sciences, medical and other subjects to generate competent professionals qualified to perform jobs and tasks in any pharmaceutical segment; at the same time it forms a solid basis for doctoral studies and is open for lifelong professional training.

The method of course selection was included in the study already during the harmonization of the programme, and it was extended to three levels in the unified master's study: alternative courses, electives offered by the Faculty, including a selection of the area of Master's thesis creation, and general selectiveness within the University. Electives are offered in such specter that covers all standard areas of narrow specializations, and follow the trends of professional developments. At the same time, we take care that the quality of teaching does not drop due to a high dispersion of students. Higher selectiveness is limited with time and spatial possibilities, as we are unable to make the study schedule in the way that would enable students to choose any combination of electives.

Harmonized MPharm. program has commenced in the academic year 2008/09. In the same year we have enrolled the first generation of students in Bologna- reformed program and offered the practical training to the last year students.

The current challenges involve fine tuning of programme (supervision of student load through ECTS), solving the financial aspects of the additional semester, and activities related to reaccreditation in 2014.

THE SCIENCE AND PRACTICE IN THE CURRICULA OF THE FACULTY OF PHARMACY AT THE UNIVERSITY "SS CYRIL AND METHODIUS" IN SKOPJE, MACEDONIA

Aleksandar J. Dimovski, K. Mladenovska

Faculty of Pharmacy, University Ss Cyril and Methodius in Skopje, Republic of Macedonia

In creating pharmacy curriculum, one must embrace many sciences (natural, health, law, economy, philosophy ...) and incorporate all attributes of the pharmacist (sociable, communicative, patient, trustworthy, persistent, methodical, analytical, well-organized, responsible.). Both types of study programs are offered at the Faculty of Pharmacy in Skopje (UKIM), academic and professional (health specialist) studies. Considering the academic programs, the following study curricula are offered: undergraduate studies in Laboratory Bioengineering (1st cycle, 3 yrs, 180 ECTS-credits), graduate studies in Master of Pharmacy (1st and 2nd cycle, 5 yrs, 300 ECTS-credits) as well as postgraduate studies (MSci studies) in Pharmacoeconomics & Health Management (2nd cycle, 2 yrs, 120 ECTS-credits). Two of the postgraduate studies are in procedure for accreditation; these are the MSci studies in Cosmetology and Phytotherapy (2nd cycle, 2 yrs, 120 ECTS-credits). Objectives of the MPharm and postgraduate academic curricula are to provide students with the basic knowledge in the design and development of drug and drug delivery systems, to introduce students in the methods and techniques for drug quality control, to develop communication skills for effective interaction with patients and with other health practitioners, to enable students to integrate the clinical knowledge in the solution of real problems and to develop stu-

dents' awareness of their responsibility for giving pharmaceutical care to their patients. Case-, project- and problem-based learning as well as experiential learning are teaching methods which prepare students the best for the practice after graduation and/or for continuing their professional and scientific development.

Integrated MPharm program leads directly to Doctoral level program(s) and other continuing education options. Aims of the PhD study curriculum in pharmacy are to provide scientific development in the field of pharmaceutical, biomedical and health sciences, to create socially responsible scientists with ability for critical thinking, healthy skepticism and sense for team work, to provide scientifically, competent human potential for continuing support to the development of the future generations and to create competitive researchers and institutions for creating and inclusion into domestic and international scientific networks and projects. PhD studies, for the first time organized according to Bologna as 3rd level study in 2011, include design of curriculum depending on the scientific interest of the PhD student under (co)mentorship. Subjects for acquiring generic knowledge and research skills, doctoral seminars, conferences, workshops, student mobility, education in the scientific field and preparation of PhD thesis are all planned for the period of 6 semesters (180 ECTS- credits) by which the student obtain the title Doctor in pharmaceutical sciences.

Professional (specialist) studies are organized both as academic at 2nd level, (Pharmacoeconomics & Health Management and Pharmaceutical regulation, 1 yr, 60 ECTS-credits), Cosmetology and Phytotherapy (in accreditation, 2nd cycle, 1 yr, 60 ECTS-credits), and health specialist studies. Study programs for the health specialist studies are completely modernized in 2011 and new curricula are introduced as well, with science and research, clinical decision, communication skills, team building, management, education and teaching skills, ethics and regulation and health promotion as common topics for all the health specialist programs. With these programs, the students acquire title specialist and competence in different fields, such as the Drug Quality Control, Sanitary Chemistry, Pharmaceutical Technology, Herbal Drugs (pharmacognosy), Clinical pharmacy, Pharmacoinformatics, Toxicological Chemistry, Medicinal Biochemistry, and Community Pharmacy and Laboratory Medicinal Genetics as new ones.

In conclusion, pharmacy is demanding curricula as it is the pharmacist's role, constantly developing, hugely varied and rewarding profession. Globalization, scientific and technology advances, information and communication technology, changes in societal and health care system are all driving force for constant creation of new curricula at the Faculty of Pharmacy (UKIM), at all levels of study according to Bologna, with an aim to prepare pharmacists to face the challenges in the new millennium.



АКАДЕМСКА СЕКЦИЈА
постер презентацији

ACADEMIC SECTION
poster presentations

PHARMACEUTICAL CARE IN THE CURRICULUM OF FACULTY OF PHARMACY AND BIO-CHEMISTRY: PAST EXPERIENCE AND FUTURE CHALLENGES

Ž. Juričić, L. Bach-Rojecky, S. Vladimir-Knežević, R. Juričić Grubešić

University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, A. Ko-vačića 1, HR-10000 Zagreb, Croatia

INTRODUCTION

Pharmaceutical care is the new concept of pharmacists' services. The idea of pharmaceutical care focuses on the responsibility of the pharmacist to meet all of the patient's drug related needs, be held accountable for meeting those needs, and assist the patient in achieving his or her medical goals through collaboration with other health professionals (1). Therefore, pharmaceutical care should be incorporated into the training of pharmacists in the conduct of their professional work.

OBJECTIVES

One of the recent aims in pharmacy education at the Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Croatia has been adoption of the concept of pharmaceutical care – concept which must identify and articulate the caring behaviors or acts which pharmacists perform in order to fulfill or advocate for fulfillment of individual patient needs. These behaviors must become expected in the professional standards of practice, resulting in routine performance in patient care (2). Pharmacists also have the responsibility of helping people to maintain good health. Becoming a skilled pharmacist requires appropriate training, assessment and feedback throughout the curriculum in developing pharmaceutical care. Therefore, it is essential that students begin their pharmaceutical care training already in the university when students have a valuable opportunity for developing skills in the delivery of care and to continue rehearsing in practical training (3).

APPLIED METHODS

The course "Pharmaceutical care" was first introduced in the curriculum of Faculty of Pharmacy and Biochemistry in Zagreb in academic year 2009/2010, on the fifth year of the module Pharmacy. The course is consisted of lectures, seminars and workshops, using the simulated patient method, case scenario, case analysis, structured interview, and problem-based study (4).

RESULTS

The lectures comprised the important and frequent subjects referred to pharmaceutical care, such as: The role of pharmacists in the rational use of antibiotics; Pharmaceutical care in diabetes; Pharmaceutical care for oncology patients; Pharmaceutical care in pain treatment; The role of pharmacists in pharmacovigilance; The role of the pharmacist in the selection of OTC drugs; Pharmaceutical care in cardiovascular disease; Ethics in pharmaceutical science and profession; Pharmacy access to rational phytotherapy; The role of quality in the implementation of pharmaceutical care; Documenting pharmaceutical care, etc. The students' seminars included some specific issues related to pharmaceutical care: Pharmaceutical care for patients with allergic rhinitis, seasonal flu, acute bronchitis, diabetic foot, mi-

graine, atopic dermatitis, and menopause; Counseling patients about complementary medicines, nutritional supplements, herbal preparations, emergency contraception, using OTC and phytotherapeutics in pregnancy, and topical application of drugs; Consulting chronic patients about self-care; Cooperation between pharmacists and physicians; The role of pharmacist in recognition of medication errors; Development of communication skills in pharmacy. The workshops dealt with the role of pharmacists in recognition of medication errors, as well as their general mission to create a helpful, trusting, and empathic relationship with patient. The questionnaire about the purpose and benefit of the course "Pharmaceutical care" was carried out among student population in order to improve contents and methods of the course. The results showed that students generally recognized the importance and usefulness of such concept as the essential step to pharmacy practice.

CONCLUSIONS

Improving pharmaceutical care skills is a challenging combination of theoretical, practical, and self-regulative knowledge. The main problem is to provide a well-defined method for structuring patient counseling skills, observation and giving feedback. Improving pharmaceutical care requires internal motivation and the training of pharmacists so that they understand their role as a part of the health care system. The greatest challenge is to change the communication culture of the pharmacy environment and increase collaboration between professions.

REFERENCES

1. Cipolle RJ, Strand LM, Morley PC. *Pharmaceutical Care Practice: the Clinician's Guide*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2004.
2. Galt KA. The Need to Define "Care" in Pharmaceutical Care: An Examination Across Research, Practice and Education. *American Journal of Pharmaceutical Education*, Vol. 64 (2000) 223-233.
3. Hyvärinen M-L, Tanskanen P, Katajavuori N, Isotalus P. Feedback in patient counseling training – Pharmacy student's opinions. *Patient Education and Counseling*, Vol. 70 (2008) 363-369.
4. Vladimir-Knežević S. Ishodi učenja – studij farmacije: In: Mesić M i Pinter Lj, eds., *Ishodi učenja na Sveučilištu u Zagrebu*. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, pp. 115-117.



СТУДЕНТСКА СЕКЦИЈА
орални презентации

STUDENTS SECTION
oral presentations

TITLES OF ORAL PRESENTATIONS (IN ORDER OF APPEARANCE)

1. Physical stability analysis of total parenteral nutrition admixture

M. Pavlovic, M. Antunovic, D. Mirkovic, A. Petrovic

2. Design and synthesis of new sulphonamide compound with potential for biological activity

E. Veljanova, E. Popovski, A. Poceva Panovska, K. Mladenovska

3. Design and synthesis of new coumarine compound with potential for biological activity

E. Stanojevska, E. Popovski, A. Poceva Panovska, K. Mladenovska

4. Influence of formulation variables on particle size distribution of L. casei loaded whey protein-alginate microparticles

J. Hadzieva, K. Smilkov, T. Petreska Ivanovska, R. Petkovska, L. Petrusevska Tozi, K. Mladenovska

5. Techniques for the preparation of biological samples: theoretical aspects of SPE

S. Petrovski, J. Tonic-Ribarska, S. Trajkovic-Jolevska

6. In vivo biodistribution of amphiphilic nanoparticles: influence of physico-chemical properties

D. Kuneski, M. Simonoska Crcarevska, S. Kuzmanovska, K. Goracinova

7. Hybrid silica particles for local colon delivery of Budesonide

O. Memed, N. Geskovski, M. Glavas Dodov

8. Examination of phenol antioxidants in berries and needles of Juniperus species from R. Macedonia

I. Spasovska, D. Stojanovski, A. Grozdanovska, M. Grozdanovska, M. Karapandzova, T. Kadifkova Panovska, G. Stefkov, S. Kulevanova

9. Macedonian Pine: potential natural source of antioxidants

G. Petrovska, I. Josifovska, V. Filipovski, A. Maslarova, M. Karapandzova, G. Stefkov, T. Kadifkova Panovska, S. Kulevanova

10. Representatives of genus Sideritis in R. Macedonia: pharmacognostic aspects

B. Petrushevski, A. Mishevska, M. Jovanovska, M. Karapandzova, G. Stefkov, S. Kulevanova

11. Polifenol and antioxidant capacity of Mountain tea (Sideritis scardica and Sideritis raeseri, Lamiaceae) from R. Macedonia

V. Apostolovska, B. Petrovska, M. Matovska, E. Kralevska, M. Karapandzova, G. Stefkov, T. Kadifkova Panovska, S. Kulevanova



СТУДЕНТСКА СЕКЦИЈА
постер презентаци

STUDENTS SECTION
poster presentations

HARMFUL EFFECTS OF UV RADIATION ON HUMAN

Daliborka Jovanova, Katerina Andonovska,
Biljana Bauer Petrovska

Faculty of Pharmacy, University of St. Cyril and Methodius, Skopje

The increase in UV radiation has a significant impact on human health because of depletion of the ozone layer in the stratosphere. Potential risks include increased incidence of morbidity from: eye diseases, skin cancer, infectious diseases and cancers. Looking at this issue from a scientific point of view is driven by different views on the impact of UV radiation on human health over the years, to take radical measures for protection from UV radiation. But only a few decades its effects were considered beneficial in conditions such as vitiligo, psoriasis, tuberculosis, and vitamin D stimulation. That is why there has been done a literary review of contemporary data on the harmful effects of UV radiation on human health.

Ultraviolet (UV), proton damages DNA molecules of living organisms in different ways. One such phenomenon is detrimental in linking bases that are adjacent to each other, rather than along the DNA sequence. This makes the bulge, and a distortion of the DNA molecule that does not work properly (1). However, throughout human evolution it evolved a defense mechanism, the enzyme T4 endonucleas protective enzyme that performs correction of the damaged DNA segment, but this protection is far from sufficient to avoid the effects of UV radiation (4).

Quantitative risk assessments are available for some effects (skin cancer), while others (infectious diseases), and are not possible due to lack of data (3). Results based on experiments with animals had given insufficient information on the quantitative assessment of the linkage of the effects of UV-B radiation due to biological differences between species, but they are quite sufficient to prove a link between exposures to the sun with harmful effects (3).

Exposure to a high cumulative dose of UV-B radiation is one of several factors clearly associated with risk of cataract of the eye. Evaluations of the effect of ozone depletion on cataract have been made and confirm the negative effect of UV-B radiation in this condition (8). The immune system is directly affected by UV radiation in humans. UV-A radiation is used for therapeutic treatment of certain skin diseases, which have immunological component. On the other hand, autoimmune diseases are aggravated by UV-B exposure. It is involved in the pathogenesis of some photo allergic and photosensitive disorders. Increasing UV-B radiation can have different and adverse effects of autoimmune and other diseases, but it is not possible to make any predictions about its impact (7).

Studies on cancer of the skin confirmed the connection between excessive exposure to sunlight and burns with the emergence of non-melanoma cancer (5). This is demonstrated in experiments with mice and testing in people with skin cancer. The connection with the sun and frequent burns in these patients and skin cancer can not be neglected as fact (6).

Contrary to public belief that *Hypericum perforatum* is good a protection from the sun, the plant has photosensitive action by which the masses are not familiar and can inflict serious damage due to its misuse. The general application of the plant is as a sunscreen, but the absorption of radiation in large doses causes redness, burns, and permanent damage to the skin epithelium (9).

Today, ultraviolet radiation has medical applications in the treatment of skin conditions like psoriasis and vitiligo. UV-A radiation is much used in combination with psoralens (PUVA treatment) of psoriasis. This multi-treatment is used less today because the combination produced dramatic increases in skin cancer and because treatment with limited doses of UV-B radiation alone is a more effective method. In cases of psoriasis and vitiligo, ultraviolet light with a wavelength of 311 nm is most effective (10).

Protection from UV radiation mostly involves prevention of ozone damage because chemical substances such as methyl bromide and chlorofluorocarbons have been omitted from use by order of EPA (Environment Protection Organization), and introduced their substitutes which do not react with free radicals (10).

The damages to the ozone moves upwards and despite all attempts to awaken the awareness of the human nation, and the harmful effects of UV-B radiation to human health grow. Most effective action on the issue would be preventive action, i.e., use of protective measures against the sun like clothes from appropriate materials, sunglasses, hats, and avoiding excessive exposure to solar radiation (2).

REFERENCES

1. Available from: <http://www.vtaide.com/png/images/atmosphere.jpg> - accessed at 06. 05. 2011.
2. Available from: <http://www.epa.gov/ozone/> - accessed at 06. 05. 2011.
3. Available from: <http://earthobservatory.nasa.gov/Features/Ozone/> - accessed at 06. 05. 2011.
4. Available from: <http://www.health.gov.au/internet/skincancer/publishing.nsf/Content/fact-u> - accessed at 06. 05. 2011.
5. Available from: http://www.google.com/url?sa=t&source=web&cd=2&ved=0CDQQFjAB&url=http%3A%2F%2Fdermatology.about.com%2Fod%2Fglossary%2Fg%2Fu%2Fuvb.htm&ei=Lg_HTa6JAcbLswa83NnODw&usq=AFQjCNHSmzgTPneorHvQoV1ytmCVHQp46A - accessed at 06. 05. 2011.
6. Available from: <http://www.skincancer.org/understanding-uva-and-uvb.html> - accessed at 06. 05. 2011.
7. Ansel, J. C., J. Mountz, A. D. Steinberg, E. DeFabo, and I. Green (1985) Effects of UV radiation on autoimmune strains of mice: Increased mortality and accelerated autoimmunity in male mice, *J. Invest. Dermatol.* 85:181-186.
8. Bochow, T. W., S. K. West, A. Azar, B. Munoz, A. Sommer, and H. R. Taylor (1989) Ultraviolet light exposure and risk of posterior subcapsular cataracts, *Arch. Ophthalmol.* 107:369-372.
9. Nemeč, M. D. (1991b) An inhalation developmental toxicity study of FM-100 in rats, WIL Research Laboratories, WIL Project No. WIL-12228.
10. Кулеванова С. Фармакогнозија, Култура, Скопје, 2002 пп 511-515

ШТЕТНО ВЛИЈАНИЕ НА УВ ЗРАЧЕЊЕ ВРЗ ЧОВЕКОТ

Далиборка Јованова, Катерина Андоновска,
Билјана Бауер Петровска

Фармацевтски факултет, Универзитет Св Кирил и Методиј, Скопје

Зголемувањето на УВ зрачењето има значително влијание врз здравјето на луѓето поради осиромашувањето на озонската обвивка во стратосферата. Потенцијалните ризици вклучуваат зголемување на инциденцата на морбидитетот од: очни болести, рак на кожата, заразни болести и канцери. Разгледувањето на ова прашање од научен аспект е поттикнато од различните ставови за влијанието на УВ зрачењето врз човековото здравје низ годините, во многу кратки временски периоди. Денес, се превземаат радикални мерки за заштита од УВ зрачењето, но само неколку декади наназад неговите ефекти се сметале за благотворни при состојби на витилиго, псоријази, туберкулоза, и за стимулација на создавање на витамин Д. Па заради тоа направен е литературен преглед на современи податоци за штетното влијание на УВ зрачење врз човековото здравје.

Ултравиолетовите (УВ) протони штетат на ДНК молекулите на живите организми на различни начини. Една таква штетна појава е во поврзувањето на базите кои се во непосредна близина едни со други, наместо долж ДНК-низот. Ова прави булбус, и искривување на ДНК молекулата која воопшто не функционира правилно (1). Сепак, низ еволуцијата хуманата популација развила механизам на одбрана, т.е. ензимот Т4 ендонуклеаза протективен ензим врши корекција на оштетениот ДНК сегмент. Но, оваа заштита е далеку од доволна за да се избегнат ефектите од УВ зрачењето (4).

Квантитативни проценки на ризикот се достапни за некои ефекти (рак на кожата), додека за другите (инфективни болести). не се можни поради недостаток на податоци (3). Резултатите базирани на експерименти со животни даваат недоволни информации за квантитативна проценка на поврзаноста на ефектите од УВ-Б зрачењето, поради биолошките разлики помеѓу видовите, но истите се сосема доволни за да се докаже поврзаноста на изложеноста на сонце со штетните ефекти (3).

Изложеноста на висока кумулативна доза на УВ-Б зрачењето е еден од неколкуте фактори јасно поврзани со ризикот од катаракта на окото. Проценки на ефектот од осиромашување на озонската обвивка на катарактата се направени и го потврдуваат негативниот ефект на УВ-Б зрачењето во оваа состојба (8).

Имуниот систем е директно засегнат од УВ зрачењето кај луѓето. УВ-А зрачењето се користи за терапевтски третман на одредени заболувања на кожата, кои имаат имунолошка компонента. Од друга страна, автоимуните болести, се отежнати од УВ –Б експозицијата. Таа е вклучена во патогенезата на некои фотоалергични и фотосензитивни болести. Зголемувањето на УВ-Б зрачењето може да има различни, и спротивни ефекти на автоимуните и другите болест, меѓутоа не е возможно да се направат било какви предвидувања за неговото влијание (7).

Студиите за рак на кожа ја потврдиле поврзаноста помеѓу претераната изложеност на сонце и изгореници со појавата на немеланомен рак (5). Ова е докажано во експерименти со глувци и испитувања кај луѓе со рак на кожа. Поврзаноста со иложувањето на сонце и честите изгореници кај овие пациенти и ракот на кожа не може да се занемарат како факт (6).

Наспроти народните верувања дека кантарионот е добра заштита од сонцето, растението има фотосензибилизирачко дејство со кое народните маси не се запознаени а може да нанесе сериозна штета поради погрешната примена. Општата примена на кантарионот како средство за сончање е во пресрет на неговото фотосензибилизирачко дејство, но, апсорпцијата на зрачењето во големи дози предизвикува црвенило, изгореници, и трајни оштетувања на кожниот епител (9).

Денес, ултравиолетовото зрачење има медицински апликации во третманот на кожата во услови како псоријаза и витилиго. УВ-А зрачењето многу се користи во комбинација со псоралени (PUVA третман) за псоријаза. Овој третман помалку се користи денес, бидејќи комбинацијата произведува драматични зголемувања на рак на кожата и бидејќи лекувањето со ограничени дози на УВ-Б зрачење само по себе е поефективна метода. Во случаи на псоријаза и витилиго, ултравиолетова светлина со бранова должина од 311 nm е најефикасна (10).

Заштитата од УВ зрачење во најголема мера вклучува и превенција во оштетувањето на озонот, затоа хемиските супстанции како метил бромидот и халогенираните хлорфлуоркарбонати се исфрлени од употреба по налог на ЕПА (Организација за заштита на околината), и се воведени нивни супституенти кои не реагираат со слободните радикали (10).

Оштетувањето на озонот се движи по нагорна линија и покрај сите обиди за будење на свеста кај хуманата нација, а со ова штетните ефекти од УВ-Б зрачењето по здравјето на човекот растат. Најефективно делување по ова прашање би било превентивното делување, односно, употреба на мерки за заштита против сонце како што се облека од соодветни материјали, очила за сонце, капи, и избегнување на претерано изложување на сончево зрачење (2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Available from: <http://www.vtaide.com/png/images/atmosphere.jpg> - accessed at 06. 05. 2011.
2. Available from: <http://www.epa.gov/ozone/> - accessed at 06. 05. 2011.
3. Available from: <http://earthobservatory.nasa.gov/Features/Ozone/> - accessed at 06. 05. 2011.
4. Available from: <http://www.health.gov.au/internet/skincancer/publishing.nsf/Content/fact-uv> - accessed at 06. 05. 2011.
5. Available from: http://www.google.com/url?sa=t&source=web&cd=2&ved=0CDQQFjAB&url=http%3A%2F%2Fdermatology.about.com%2Fod%2Fglossary%2F%2Fuvb.htm&ei=Lg_HTa6JAcblswa83NnODw&usq=AFQjCNHSmzgTPneorHvQoV1ytmCVHQp46A - accessed at 06. 05. 2011.
6. Available from: <http://www.skincancer.org/understanding-uva-and-uvb.html> - accessed at 06. 05. 2011.
7. Ansel, J. C., J. Mountz, A. D. Steinberg, E. DeFabo, and I. Green (1985) Effects of UV radiation on autoimmune strains of mice: Increased mortality and accelerated autoimmunity in male mice, *J. Invest. Dermatol.* 85:181-186.
8. Bochow, T. W., S. K. West, A. Azar, B. Munoz, A. Sommer, and H. R. Taylor (1989) Ultraviolet light exposure and risk of posterior subcapsular cataracts, *Arch. Ophthalmol.* 107:369-372.
9. Nemeč, M. D. (1991b) An inhalation developmental toxicity study of FM-100 in rats, WIL Research Laboratories, WIL Project No. WIL-12228.
10. Кулеванова С. Фармакогнозија, Култура, Скопје, 2002 пп 511-515

USE OF POPPY THROUGH THE AGES

Katerina Andonovska, Daliborka Jovanova, Biljana Bauer Petrovska

Faculty of Pharmacy, University of St. Cyril and Methodius, Skopje, R. Macedonia

The nature of man is to be forever dissatisfied with achievements, to compare with others and to strive to greater achievements. That feature is its strong momentum for the largest, and in medicine and the most human achievements in the fight for human health and happiness.

Trying to live in a world without pain, the man repeatedly trace to detect an ingredient that will make his life easier. So, reveals opium. Opium might spans millennia with its analgesic nature, but it is interesting that today takes its primacy narcotic action. The introduction to the development of ideas related to the poppy, and the evolution of knowledge, increase the ability of pharmacists and physicians to respond to the challenges that arise with the spread of professional services in facilitating the life of man.

For sedative role of poppy seed was known in the Minoan civilization (about 2700-1450 BC) and Bronze Age poppy was cultivated on the island of Crete, for the seed. Poppy seed have been long used as a means of causing sleep, wealth and fertility, and even magical powers of invisibility.

Sumerian peoples wrote about the use of poppy seed in ancient medical texts in the old civilization. There are data that in 1550 BC in Egypt poppy seeds used as a sedative and it is written in Egyptian Papyri (Ebert parchment) (1).

The stored records that dates back to 7th century BC recorded on clay flats in the biggest library following the old century and founded in Nanivi King, Ashurbanipal of Assyria (668-626 BC) shows that opium then had an important role as an agent against pain. The Mediterranean used poppy leaves extract (juice obtained by pressing the whole herb). In the 4th century BC in Greece, was known for opos milky juice of poppy. From Greece opium is transported to Rome. Arabian peoples in 6th and 7th century opium transferred to Persia, India and China (2).

Evidence of knowledge of the opium poppy in Macedonia is a detail of frescoes in the monastery of St. George in the village Kurbinovo - Prespa, which originated from 1191 year and showing the poppy. This is a very picturesque and oldest evidence of Slavic knowledge of poppy (3).

Physician Paracelzsius (1493-1541) is credited with tincture of opium (solution of opium and alcohol, called laudanum).

Chinese in 18th century were so-called special opium dens that were gathered and smoked opium mixed with tobacco (for better fuel). Opium, precious means pain began to be abused in large scale in Asia, particularly China. To date abuse can not be eradicated. Chinese who use to treat dysentery, later began to abuse. In the beginning they use for chewing, and 17th century began to smoke. Smoking opium has been spread because of poverty and hunger in China then, as opium among other things, reduces appetite and suppresses feelings of hunger (2).

Pharmacist V. Serturner in 1806 year mention the morphine from opium. French pharmacist Tiloj of Dijon in 1823 year, and somewhat later in Germany, F. L. and H. Winkler and H. E. Merck, failed to differentiate morphine from poppy.

The problem of abuse of opium in China led to an international polit-

ical problem and the emergence of two opium wars. First Opium War began in 1839 year when the Chinese emperor's son died from overdose of opium. Yard ordered to seize and destroy the opium. Arrested was the import of goods from England. It was a reason to break out war between China and England. Second Opium War (1857-1860) against China, besides England and France were the United States. Again China lost the war. The foreigners were opened new ports (2).

Opium meet in pharmacopoeias in various galenic preparations. Thus, in Ph. Jug I (1933). There are: Opium crudum, Opii pulvis, Opii ekstraktum (contains 20% morphine), Opii sirup, Opii tinctura, Opii tinctura (with saffron), Papaverini hidrohloridi (4).

Standardized medical or opium - Pulvis Opii, Opium pulveratum, Pulvis Opii standardisatus, was prescribed in Ph. Jug. II (1951) (5).

In an order of Ph. Jug. III (from 1951 to 1984) Opium was dilute with lactose and had to contain 9.8 to 10.2% morphine. It is used as analgesic and antidiaric (6).

In Ph. Jug. IV (1984) was prescribed: Opium titratum (or Pulvis opii standardisatus), Papaverini chloridum, Papaverini hidrohloridum (7).

European Pharmacopoeia, fifth edition (2005), mentions Papaver hidrohlorid (8).

U.S. Pharmacopoeia 30 (2007) provides: Opium tincture (from 0.90 grams to 1.10 grams of anhydrous morphine), Opium pulvis (10-10,5% anhydrous morphine) and Paregoric (opium powder 4,3 g, essential oil, benzoic acid, 3,8 g, dilute ethanol 900 ml, glycerol 38 ml, to do for 950 ml.) (9).

Due to the great abuse of opium, is now producing a limited number of countries and for medicinal purposes and for scientific research, under strict control of the authoritative factors. The United Nations after the war (1946 year) taken rigorous measures, to limit and prevent the cultivation of opium poppy (*P. somniferum*) and production of opium. In 1953 year the New York Protocol, limited production of opium in: Iran, India, Russia, Greece, Turkey, Bulgaria. Here, the law of production and trade of narcotic drugs prohibited any production of opium, except for scientific research purposes (10).

So, looking through the history of the use of opium was made a twist in its original function. Thus the analgesic crossed into an instrument for the spread of drug addiction, and today the means of economic prestige and political power.

REFERENCES

1. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=opium%20in%20iron%20age&http://en.wikipedia.org/wiki/Poppy_seed
2. M. Gorunovic, P. Lukic, Farmakognozija, 1 st ed., Belgrad, 2001.
3. G. Nikolov, Afionot vo Makedonija, Etnolog (3), 89-100, Skopje, 1993.
4. Ph. Jug I (Jugoslovenska Farmakopeja), 1 st ed., Apotekarske komore kraljevine Jugoslavije, Belgrad, 1933.
5. Ph. Jug II (Jugoslovenska Farmakopeja), 2 nd ed., Medicinska knjiga, Belgrad, 1951.
6. P. B. Lukic, Farmakognozija, 3 rd ed, Beograd, 1985.
7. Ph. Jug IV (Jugoslovenska Farmakopeja), 1 st ed., Medicinska knjiga, Belgrad, 1984.
8. European Pharmacopoeial, 5 th ed., 2005.
9. The United States Pharmacopoeial 30, NF-25 th ed., Best regards, Lawrence, 2007.
10. V. Dervendzi, Prirodni lekoviti i aromaticni surovini, 1 st ed., Nasa Kniga, Skopje, 1986.

УПОТРЕБА НА АФИОНОТ НИЗ ВЕКОВИТЕ

Катерина Андоновска, Далиборка Јованова,
Билјана Бауер Петровска

Фармацевтски факултет, Универзитет Св Кирил и Методиј, Скопје

Во природата на човекот е да биде вечно незадоволен од постигнатото, да се споредува со другите и да тежи кон се поголеми достигнувања. Таа негова особина претставува силен импулс за најголеми, а во медицината и за најхумани дострели во борбата за човековите здравје и среќа.

Обидувајќи се да живее во свет без болки, човекот постојано трага кон откривање на состојка која ќе му го олесни животот. Така го открива опиум. Опиумот можеби спојува милениуми со неговата аналгетска природа, но интересно е што денес приматот го превзема неговото наркотизиращко дејство. Запознавањето со развојот на идеите поврзани со афионот, како и еволуцијата на сознанијата, ја зголемуваат способноста на фармацевтите и лекарите да одговорат на предизвиците кои се јавуваат со ширење на професионални услуги во олеснување на животот на човекот.

За седативната улога на семето од афион се знаело во минојската цивилизација (околу 2700-1450 година п.н.е.), а во бронзеното доба афионот се одгледувал и на островот Крит, за добивање на семе. Семето од афионот долго се користело како средство што предизвикува спиење, богатство и плодност, па дури и маѓиска моќ на невидливост.

Сумерјаните пишувале за употребата на афионовото семе во античките медицински текстови во старата цивилизација. Има податоци дека во 1550 г. п. н. е. во Египет се користело семето од афион како седатив и тоа е запишано на Египетски папируси (Еберстови пергаменти) (1).

Од зачувани податоци кои датират од VII век п. н. е. запишани на глинени табли во најголемата библиотека на стариот век која ја основал во Наниви асирскиот крал Асурбанипал (668-626 п. н. е.), се гледа дека тогаш опиумот имал важна улога како средство против болки. На Медитеранот се употребувал екстракт од афионски листови (сок добиен со цедење на целата билка). Во IV век п. н. е., во Грција, се знаело за опос млечен сок од незрели чушки. Од Грција опиумот се пренел во Рим. Арабјаните во VI и VII век го пренеле опиумот во Персија, Индија и Кина (2).

Доказ за познавањето на афионот во Македонија е деталот од еден фрескоживопис во манастирот „Свети Ѓорѓи“ во с. Курбиново - Преспа, кој потекнува од 1191 година и на кој се прикажани афионски чушки. Ова претставува и најстар сликовит доказ за словенското познавање на афионот (3).

Лекарот Парацелзиус (1493-1541) е заслужен за тинктура од опиум (раствор на опиум и алкохол, наречен лауданум).

Кинезите во XVIII век имале специјални пушилници т.н. опиумски дувла во кои се собирале и пушеле опиум измешан со тутун (за подобро да гори).

Опиумот, драгоценото средство против болки почнал да се злоупотребува во големи размери во Азија, особено во Кина. До денес злоупотребата не може да се искорени. Кинезите кои го употребувале за лечење дизентерија, подоцна почнале да го злоупотребуваат. Во почетокот го жвакале, а од XVII век почнале да го пушат. Пушењето опиум се ширело и поради сиромаштијата и гладот во тогашна Кина, бидејќи опиумот покрај останатото, намалува апетит и го потиснува чувството на глад (2).

Аптекарот В. Сертурнер, во 1806 година го издвоил морфинот од

опиумот. Францускиот аптекар Тилој од Дижон во 1823 година, а нешто покасно и во Германија, Ф. Л. Винклер и Х. Е. Мерк, успеале да го издвојат морфинот од афионовите чушки.

Проблемот на злоупотреба на опиум во Кина довел до меѓународен политички проблем и избивање на две опиумски војни. Првата опиумска војна започнала 1839 година откако синот на кинескиот цар починал од предозирањето со опиум. Дворот наредил да се заплени и уништи целиот опиум. Стопиран бил увозот на целата роба од Англија. Тоа било причина да избие војна меѓу Кина и Англија. Втората опиумска војна (1857-1860) против Кина, покрај Англија биле и Франција и САД. Двете војни Кина ги изгубила. За странците биле отворени нови пристаништа (2).

Опиумот се сретнувал во фармакопеите, во различни галенски препарати. Така во Ph. Jug I (1933 год.) пропишувани биле: Opium crudum, Opium pulvis, Opium ekstrakt (содржи 20% морфин), Opium sirup, Opium tinktura, Opium tinktura (со шафран), Papaverini hydrochloridi (4). Стандардизиран или медицински опиум – Pulvis Opium, Opium pulveratum, Pulvis Opium standardisatus, бил пропишан од Ph. Jug II (1951 год.) (5).

По пропис од Ph. Jug. III (од 1951 до 1984) опиумот се разблажувал со лактоза и морал да содржи 9,8-10,2% морфин. Се употребувал како аналгетик и антидијароик (6).

Ph. Jug. IV (1984) пропишувала: Opium titratum (или Pulvis opium standardisatus), Papaverini chloridum, Papaverini hydrochloridum (7). Во Европската Фармакопеја, петто издание (2005), се споменува Papaver hydrochlorid (8).

Американската Фармакопеја 30 (2007) пропишува: Opium tincture (од 0,90 гр до 1,10 гр безводен морфин), Opium pulvis (10-10,5% безводен морфин) и Paregoric (опиум во прав 4,3 г, етерично масло, бензоева киселина 3,8 г, дилуиран етанол 900 ml, глицерин 38 ml, да се направи за 950 ml.) (9).

Поради големата злоупотреба на опиумот, денес се произведува во ограничен број земји и тоа за медицински цели и за научни истражувања, под строга контрола на меродавни фактори. Организацијата на ОН по војната (1946 год.) превзела ригорозни мерки, како би се ограничило и спречило култивирањето на афионот (*P. somniferum*) и производството на опиумот. Во 1953 год. со Њујоршкиот протокол, било ограничено производството на опиумот во: Иран, Индија, Русија, Грција, Турција, Бугарија. Кај нас, со законот за производство и промет на опојни дроги забрането е секако производство на опиум, освен за научно истражувачки цели (10).

Значи гледајќи низ историјата на употребата на опиумот направен е пресврт во неговата првобитна функција. Така од аналгетик преминал во средство за ширење на наркоманијата, а денес и во средство за економски престиж и политичка моќ.

ЛИТЕРАТУРА

1. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=opium%20in%20iron%20age&http://e.wikipedia.org/wiki/Poppy_seed
2. M. Gorunovic, P. Lukic, Farmakognozija, 1 st ed., Belgrad, 2001.
3. G. Nikolov, Afionot vo Makedonija, Etnolog (3), 89-100, Skopje, 1993.
4. Ph. Jug I (Jugoslovenska Farmakopeja), 1 st ed., Apotekarske komore kraljevine Jugoslavije, Belgrad, 1933.
5. Ph. Jug II (Jugoslovenska Farmakopeja), 2 nd ed., Medicinska knjiga, Belgrad, 1951.
6. P. B. Lukic, Farmakognozija, 3 rd ed, Beograd, 1985.
7. Ph. Jug IV (Jugoslovenska Farmakopeja), 1 st ed., Medicinska knjiga, Belgrad, 1984.
8. European Pharmacopoeial, 5 th ed., 2005.
9. The United States Pharmacopoeial 30, NF-25 th ed., Best regards, Lawrence, 2007.
10. V. Dervendzi, Prirodni lekoviti i aromaticni surovini, 1 st ed., Nasa Kniga, Skopje, 1986.



ДРУГИ

OTHER

IMPORTANCE OF TRADE MARKS FOR PHARMACEUTICAL PRODUCTS

Katerina Ancevska Netkovska

Faculty of Pharmacy, University "Ss Cyril and Methodius", Skopje, Rep. of Macedonia,

INTRODUCTION

Trade marks as a social phenomenon in the modern economy are part of the competitive market of products and services. Trade mark is the connection between subjects on the market, where manufacturer identifies their products, and customer could recognize favorites one responding to their needs. One of the world's largest consumer goods markets - pharmaceuticals - should for so long have flourished with little help from brands (1). Pharmaceutical dosage forms are different from other products because the relation with the customers is most often indirectly. Brands thrive where the relationship between buyer and seller is direct and open, where choice is transparent and availability unrestricted. Successful pharmaceutical companies are rich in intellectual property, which has taken the form of patents, and now brands can add layers of sustainable value, and managing the branding process, prolonging a good product's life.

BRANDS AND CONSUMER

In the world of consumer goods and services, companies have used branding techniques to achieve competitive advantage for decades. Such techniques involve the development of a set of distinguishing characteristics in the product (or service), which are capable of having a strong and distinctive impression on the customer (2). These impressions are created through the product itself, which is with acceptable quality and fully capable of performing its functional role, through the packaging - which must both protect the contents and allow the product to be accessed easily and in the required quantities. Trade marks influenced through the brand name, package, through the brand image and the advertising.

The global pharmaceutical industry is undergoing profound change, and pharmaceutical companies - traditionally science and sales-driven businesses - must embrace marketing and branding strategies to a much greater extent than they have done in the past. Brand building during the period when new drug remains under patent can help prolong the commercial life of the product once its monopoly status lapses. And strongly branded prescription drugs can make the transition into the over-the-counter (OTC) arena more easily. The role and value of branding in the pharmaceutical industry is changing.

CONCLUSION

Trade marks have barely existed in the pharmaceutical industry, yet the word 'brand' is used indiscriminately and, largely, inaccurately. Trade mark by definition is the act of finding new product, launching it into the marketplace, advertising it, and then giving up all support when the patent lapses. By contrast, the economics of the big pharmaceutical companies are locked into product life cycles of limited duration. The critical factor in the economic equation is the patent and the amount of time that is available to the company to maximise the return on its investment, the majority of which will have been ploughed into the research and development required to create the new drug in the first place. Advertising and promotion is therefore of critical importance in the early stages of a new pharmaceutical brand's

life, to maximise awareness and, hopefully, trial of the new product. It is then required again at the mid-point of the brand's life, to reinforce and remind buyers of the product's efficacy - now proven through several years' performance. Then it is needed again over the latter stages, in the final scramble to extract every last cent of revenue before the patent lapses, generic imitations appear on the scene, and the price plunges. It is clear that the competitive environment is becoming harsher in the pharmaceutical industry and the necessity for health care systems to adopt generics will only accelerate the decline of branded sales post patent expiration, unless the industry manages itself differently. This is why we consider that branding can represent a new competitive advantage.

REFERENCES

1. Tom Blackett and Rebecca Robins., 2001. Brand Medicine: The Role of Branding in the Pharmaceutical Industry, Palgrave, New York.
2. Schuiling Isabelle and Giles Moss., 2004. How different are branding strategies in the pharmaceutical industry and the fast-moving consumer goods sector?, The Journal of Brand Management, Vol.11 No.5, 36.

ЗНАЧЕЊЕТО НА ТРГОВСКАТА МАРКА ЗА ФАРМАЦЕВТСКИТЕ ПРОИЗВОДИ

Катерина Анчевска Нетковска

Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ Скопје, Р.Македонија

ВОВЕД

Трговската марка како општествен феномен во модерната економија претставува неопходност на пазарот на кој доминира масовното производство и кој изобилува од конкурентни стоки и услуги. Трговската марка е најсуптилна врска помеѓу субјектите на пазарот, каде што потрошувачите ги идентификуваат своите омилене производи кои одговараат на нивните желби и потреби. За современиот потрошувач надворешните елементи се пресудни и кога производите треба да бидат избрани според нивните карактеристики (корисноста, сигурноста, трајноста, квалитетот и сл), сите овие значајни за фармацевтските производи. Еден од најголемите пазари на потрошувачки добра на светот, а тоа се производите од фармацевтската индустрија, долго просперираа со малку помош од брендovите (1). За разлика од другите производи кај фармацевтските производи, релацијата со потрошувачот се остварува најчесто преку трети лица. Брендovите се развиваат каде што односот помеѓу купувачот и продавачот е директен и отворен, каде изборот е транспарентен, а расположливоста неограничена. Денешните, пред сè успешни фармацевтски компании располагаат со интелектуална сопственост, кои преку патенти, а сега и со брендovите на своите производи можат да додаваат вредност на својот стекнат капитал, и преку управувањето со процесот на брендирање да го продолжат животниот век на добриот производ.

БРЕНДОТ И ПОТРОШУВАЧИТЕ

Во светот на потрошувачки добра и услуги, компаниите со децении употребувале техники на брендирање, за да постигнат конкурентска предност, кои можат да имаат силен и специфичен впечаток врз потрошувачот (2). Овие впечатоци се остваруваат преку самиот производ, кој мора да биде со прифатлив квалитет, исто така

влијание има и самата амбалажа, која меѓу другото овозможува производот да биде лесно достапен и препознатлив. Трговската марка, влијае на потрошувачите со силината на својот „бренд“, кој се постигнува преку името, креацијата на амбалажата и секако рекламата. Она што ги разликува брендovите, како една од основните функции на трговската марка е нивната различност, уникатната привлечност, што сопствениците ја негуваат низ годините. Тука фармацевтската индустрија многу се разликува од другите индустрии на потрошувачки добра. За создавањето на бренд, потребни се децении на инвестиции во рекламирање, промоција и дистрибуција.

Од друга страна, постои ограничување на траење на нивните производи. Како клучен фактор се јавува патентот и времето, кое компанијата го има на располагање, за да успее да ја поврати инвестицијата, и повторно да вложува во истражувањето и развојот, кое е неопходно за да се создаде нов лек. Кога станува збор за потрошувачот, и неговата одлука за купување, многу е значајна врска на идентитетот на производот и неговиот карактер, т.е. ефектот и авторитетот на брендот кој ќе го побуди кај истите. Затоа, рекламирањето и промоцијата се од клучно значење во раните фази на животниот век на брендот на новиот лек. Рекламирањето е еден од факторите кој има дадено придонес за успешно брендирање на лековите заради можноста на директна комуникацијата со пациентот, кампањи наречени DTC (direct to customer-директно до потрошувачот), присутни од деведесеттите години, за разлика од претходно кога се рекламираа само фармацевтските производи достапни до пациентите/потрошувачите без рецепт познати како „лекови,, од OTC- листа. (over the counter-преку рецептурата).

ЗАКЛУЧОК

Иако, трговските марки низ историјата одвај се препознавале во фармацевтската индустрија, сепак зборот „бренд“ се употребувал неселективно и во голема мера, неточно. Трговската марка, најопшто, може да се дефинира како знак со кој се обележуваат стоките и услугите на еден стопански субјект на пазарот, а со цел нивна идентификација и разликување од исти или слични стоки и услуги на друг стопански субјект. Со трговска марка се заштитуваат сите овие знаци кои ги исполнуваат условите пропишани со закон. Брендирањето на фармацевтските производи значи наоѓање на заштитен знак за нов производ, негово лансирање на пазарот и рекламирање, а потоа откажување на целата поддршка кога ќе истече важењето на патентот.

Фармацевтските компании, чии бизниси воглавном се насочени и водени од науката и продажбата, употребуваат стратегии за маркетинг и брендирање. Создавањето на бренд во текот на периодот во кој лекот останува патентиран може да помогне да се продолжи комерцијалниот век на производот, штом истече неговиот статус на монопол. Лековите на рецепт со силен бренд можат многу полесно да преминат на сцената преку шалтерот до потрошувачот. Улогата и вредноста на брендирањето на фармацевтските производи се менува. Нивното создавање им овозможува на фирмите да ги диференцираат производите наспроти својата конкуренција, преку употреба на материјални и нематеријални придобивки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tom Blackett and Rebecca Robins., 2001. Brand Medicine: The Role of Branding in the Pharmaceutical Industry, Palgrave, New York.
2. Schuling Isabelle and Giles Moss., 2004. How different are branding strategies in the pharmaceutical industry and the fast-moving consumer good sector?, The Journal of Brand Manegmant, Vol.11 No.5, 36.

ADENDUM

The abstracts for the following lectures were not received before the closing submission date

Biosimilars/biogenerics – an overview
Sergio Tisiminetsky

INDEX

- A**
- Abazi S. 203, 204
 Acevska J. 7, 9, 11, 13, 15, 68
 Acevski S. 101, 109
 Adamova E. 265, 292, 299
 Agbaba D. 37
 Aleksandric A. 29
 Aleksievska
 Beldedovska K. 248
 Alipieva K. 210
 Ameti A. 39
 Ancevska Netkovska K. 370
 Andonovska K. 86
 Andonovska K. 364, 366
 Anevskina M. 265, 292, 299
 Anevskina-Stojanovska N. 79, 291
 Angelova S. 143, 158
 Angelovska B. 106, 108, 147
 Antonić R. 121
 Antovska P. 268, 272, 280
 Antunovic M. 256
 Apostolova M. 226
 Apostolski S. 316, 318, 320, 323
 Arsić I. 140
 Arsova –Sarafinovska Z. 40, 50, 52
 Arsovska A. 42
 Asllani U. 200
 Atanacković M. 255
 Atanasković, D. 41
 Atanasoski D. 253, 287
 Atanasovska S. 50
 Atkinson J. 356
 Aviello G. 206
- B**
- Babic J. 112
 Babunovska H. 23, 25, 29, 31, 32, 33, 36, 38, 246
 Bačeva K. 215, 219
 Balabanova V. 193
 Balestrieri E. 194
 Baneva N. 42
 Banjac G. 170, 171, 172
 Banjac L. 170, 171
 Bankova V. 210
 Basha B. 194, 200, 257
 Batta G. 232
 Bauer Petrovska B. 131, 161, 163, 165, 204, 207, 364, 366
 Baumagrtner S. 227
 Benković G. 28
 Betül Demirci B. 210
 Bezhani B. 97
 Bileva M. 102
 Bilsborough S. 129
 Bocevska M. 159
 Boerlum Kristensen F. 2
 Bogdanov J. 172
 Bogdanovska L. 68, 71, 77
 Bogovska T. 25
 Bojić M. 180
 Borrelli F. 206
 Božić B. 356
 Brašnarska I. 54, 74, 230
 Breznica P. 345
 Brezovska K. 9, 9, 11, 13, 15, 57, 60, 318, 320, 323
 Brniak W. 229
 Brziłova K. 66
 Buble T. 98
- Buha A. 149
 Bulat Z. 149, 150
 Bursać M. 255
 Butikoski F. 280
- C**
- Calija B. 233
 Çaliş S. 226, 238, 306
 Čanadanović-Brunet J. 206
 Čanadi J. 232
 Čano A. 97
 Cekic N. 233
 Cekovska S. 163
 Chlebek J. 190
 Crcoroska M. 197
 Čudina B. 28
 Culeva B. 160
 Cvejić J. 255
 Cvetanovska A. 204
 Cvetanovska L. 204
 Cvetkovic T. 329
 Cvetkovikj I. 183, 218
 Cvetkovska
 Dimitrovska A. 346
 Cvetkovska E. 42
 Cvetkovska E. 297, 302
 Czech M. 94
- D**
- Dabanović V. 340
 Daka A. 345
 Damcevska D. 29
 Dameska R. 265, 292, 299
 Davceva M. 289
 Davcheva M. 283
 Debarlieva B. 74, 280
 Demirci, S. 210
 Denic M. 21
 Đermanović M. 106
 Despotovska S. 32
 Di Martino P. 259
 Dibra A. 122
 Đikić T. 149
 Dilber S. 335, 341
 Dimcevska S. 238, 295, 306
 Dimčevska S. 272, 280
 Dimchevska S. 268
 Dimitrov I. 226
 Dimitrova – Zheleva D. 193
 Dimitrovska A. 7, 9, 11, 13, 15, 57, 60, 68, 71, 77, 311
 Dimitrovska M. 159, 160
 Dimitrovska
 Manojlovikj T. 250
 Dimova C. 147
 Dimova D. 265, 292, 299
 Dimovski A. 325, 348, 357
 Dinga L. 189
 Dinić Milisavljević V. 291
 Djordjevic Catic A. 329
 Djukic-Cosic D. 149
 Dobrkovic M. 31
 Dodig S. 141
 Dokik - Trajkovska E. 181, 323
 Dolikoska C. 29
 Doneva D. 40, 50
 Đorđević B. 150
 Đorđević S. 173
 Đorđević S. 195
 Doytchinova I. 340

Draganic P.	168	Ilioska-Zlatanovic S.	23, 246
Đrđević B.	335	Indić I.	330
Drobac – Pavlović M.	192	Injac R.	124
Dubrova V.	36	Ivanišević J.	149, 170, 171, 172
Dubrova-Koceva V.	31	Ivanoska M.	32
Dylgjeri K.	201	Ivanov D.	342
Dyulgerova - Dimitrova I.	193	Ivanovska M.	25
		Ivanovska V.	106, 108
E		Ivceska L.	265, 292, 299
Efremova D.	90, 129, 155, 167, 169	Ivkovic M.	119
Efremova S.	155		
Erdem A.	334	J	
Eric M.	112	Jachowicz R.	229
Esra Eroğlu Özkan	210	Jakimova D.	143, 158
Evgenievska G.	25, 36	Jakovljević I.	149
		Jančić-Stojanović B.	45, 46
F		Janeva S.	33
Fida M.	122	Janevik-Ivanovska E.	311
Filipic S.	47	Jankoska G.	163
Filipović S.	341	Janković S.	263
Frydenvang K.	336	Johansen N.T.	336
		Jones C. S.	3
G		Jordanoska S.	235
Gacova M.	147	Josifovski T.	348
Gala T.	103	Jovanova D.	364, 366
Gašperlin M.	356	Jovanović J.M.	156
Gavazova Kozareva K.	111	Jovanović T.	341
Georgieva A.	66, 302	Jovanovik A.	79
Geskovski N.	126, 238, 240, 285, 295, 297, 302, 304, 306	Jovanovska Jankovska V.	26, 253
Getov I.	102, 120	Jovanovska Klincarska I.	204
Gevrenova R.	196	Jovčić M.	335
Giceva A.	33, 36	Jucja B.	194, 328
Gigov J.	330	Jugreva K.	131
Gigov S.	330	Juričić Ž.	360
Gjorgieva D.	133, 144, 146, 197		
Gjorgjeska B.	22	K	
Glavas Dodov M.	238, 240, 285, 291, 295, 297, 302, 304, 309	Kadifkova-Panovska T.	95, 129, 133, 136, 144, 146, 158, 167, 169, 179
Gligorova M.	287, 313	Kafedziska D.	38
Globocki M.	84, 86	Kaftandzieva A.	181
Goci E.	196, 202	Kajdzanoska M.	230
Gojkovic T.	170, 171	Kaličanin B.	140
Gojković-Bukarica Lj.	255	Kamcev N.	147
Golocorbin-Kon S.	49, 264, 330	Karadzinska E.	253
Goracinova K.	238, 240, 295, 297, 302, 304, 306, 309	Karalija N.	54, 230
Grković A.	149	Karapandzova M.	181, 212, 215, 218, 219
Grozdanov A.	285	Karcev V.	71
Grozdanova A.	115, 318, 320, 323	Karljikovic-Rajic K.	125
Grubešić Jurišić R.	188, 360	Kavrovski Z.	131, 207
Gulija M.	100, 114	Kazandzievska E.	66
		Kellici N.	122
H		Kellici S.	122, 194, 201, 257, 259
Hadjihamza M.	89, 95	Kikovska-Stojanovska E.	54, 74, 230
Hadzieva J.	126	Kilibarda V.	173
Hadzieva M.	57, 60, 77	Kirovska Cigulevska O.	165
Hatibi M.	200	Kitanov G.	193
Haxhiu A.	42	Kiteva G.	42
Heinle H.	255	Kiteva Trenceska G.	316
Hilaj E.	201	Kızılarslan Ç.	222
Hiljadnikova Bajro M.	137	Kjovkarovska – Dinevska S.	217
Hoti E.	118, 194, 259	Klopcheska J.	184
Hristova K.	98	Knežević - Vladimir S.	360
Hudhra D.	258, 328	Knöss W.	3
Hudhra K.	328	Kocić G.M.	156
Hüsnü Can Başer K.	210	Kocovska Zdraveska M	240
		Kosalec I.	188
I		Kostandinovska E.	133, 146
Ignea C.	183	Kostić N.	45, 46
Ilić D.	262	Kostoska R.	87
Ilievska M.	26, 248, 253, 283		

Kostoski S.	151	Mesiti A.	189
Kostova M.	154	Mickoska I.	79, 235
Kostovski D.	274, 277	Mickova Dimitrova K.	135
Kotur-Stevuljevic J.	149, 170, 171, 172	Mihaljic S.	247
Kovačević – Vezmar S.	121	Mikhova B.	343
Kovačević N.	192	Mikov M.	49, 294, 330
Kovacevic T.	33	Mikulčić D.	28
Kovacevik B.	133, 146	Milenković M.	192, 334, 341, 343, 348
Kozarova R.	226	Milenković Popović M.	331
Kozuharova E.	193	Mileva E.	161
Kratochvílová E.	190	Milic J.	210
Kremer D.	188	Milić N.	206
Krizman M.	37	Miljkovic M.	170, 171, 172
Krluku V.	218	Milosavljević S.	176
Krškova Z.	191	Milovanović L.	47
Krsteska Lj.	274, 277	Mindoseva M.	83
Krstić G.	121	Minga Gj.	328
Krstić N.S.	156	Miova B.	217
Krupa A.	229	Miraci M.	122, 201, 257
Krušaravska N.	172	Mirkovic D.	256
Kujundžić S.	210	Mitić S.	24, 121
Kukeska S.	6	Mitreski I.	82, 86
Kukovska V.	313	Mitrev S.	133, 146
Kulevanova S.	177, 179, 181, 183, 210, 21, 215, 217, 218, 219	Mitrulovska T.	235
Kuli A.	95	Mladenova - Nikolova B.	342
Kültür Ş.	210	Mladenovska K.	126, 285, 295, 357
Kundaković T.	209		
Kungulovski D.	246	N	
Kuntić V.	20	Nadazdin M.	119
Kuzmanovska O.	254	Najdenkoska A.	160
Kuzmanovska S.	240	Najdovska E.	259
Kuzmanovski I.	42	Nakov N.	57, 68, 71, 77
Kuzmanovski I.	135	Nanova B.	287
		Nasteska-Nedanovska V.	87
L		Nastova B.	50
Lachmann B.	345	Naumović S.	140
Lakušić B.	192, 199	Naumovska M.	31
Lakušić D.	199	Naumovska S.	38
Lalić M.	35	Naumovska Z.	131
Lalić Popović M.	264, 330	Nebija D.	345
Laušević M.	51	Nedjić T.	48
Lazarevska E.	86	Neshova S.	167, 169
Lazova T.	330	Nestorovic S.	101
Lebanova H.	102, 120	Nestorovska K. A.	115, 346, 348
Lepčevska D.	265, 292, 299	Niketić M.	192
Litovin H.	265, 292, 295, 299	Nikolić G.M.	51
Lukić S.	121	Nikolic K.	37
		Nikolić Lj.	262
M		Nikolić R.S.	156
Macáková K.	190	Nikolić V.	262
Makraduli L.	265, 292, 299	Niwiński K.	207
Makris A.	183	Noe R.	345
Malaj L.	118, 196, 258, 259	Novevska V.	142
Malenović A.	45, 46		
Manasova M.	36	O	
Mandić A.	206	Obreshkova D.	154
Manolov D.K.	120	Opletal L.	190
Manov G.	143	Ortakova O.	39
Marčetić M.	192	Otašević B.	20
Marić S.	106	Ōzhatay N.	221, 222
Marinković V.	263		
Marković B.	46, 125, 210, 334	P	
Martin J.	189, 191	Pachova D.	269
Mat A.	210	Pankova S.	154
Matovic V.	149	Pantović A.	334
Mehmeti E.	203	Paripović D.	172
Memed-Sejfulah S.	54, 66, 209	Pavicevic B.	287
Menković N.	177	Pavicic N.	47
		Pavlovic M.	192

Pavlovska M.	250, 251	Šapkareva B.	54, 66, 74, 79, 209
Peco-Antic A.	171, 172	Šarić - Medić M.	180
Peikov Pl.	341	Savić J.	210, 334, 343
Pejčić Z.	48	Savić S.	210
Pešić M.	121	Savić V.	262, 263
Petkovic M.	21	Sekovanic A.	265, 292, 299
Petkovska Popovska E.	140	Sela F.	212
Petkovska R.	68, 71, 77, 285	Šepić G.	188
Petlevski R.	141	Serafimovska	
Petreska Ivanovska T.	126, 285	Trendovska G.	82, 83, 84, 86, 90
Petreska J.	210, 217	Shengjergji D.	201
Petreska M.	83, 86	Shishovska M.	39, 40, 52
Petric M.	101	Shkreli R.	196, 203
Petrov I.	42	Simeonovska S.	54, 66, 209
Petrova E.	204	Simjanovska M.	23, 246
Petrovska V.	302	Simonoska	
Petrovic A.	256	Crcarevska M.	238, 240, 295, 297, 302, 304
Petrović S.	192	Simonova V.	269
Petrović S.	172	Simonovska B.	23, 151, 153
Petrović V.	149	Simonovski N.	151, 153
Petrovska Angelovska A.	111	Sjölin-Forsberg G.	2
Petrovski S.	63	Skórka T.	207
Petruseva P.	32	Slaveska Raicki R.	95, 136, 184
Petrusevska G.	217	Slavevska I.S.	82, 83, 84
Petrusevska -Tozi L.	126, 142, 285	Slavković J.	209
Petruševski G.	54, 66, 209, 272, 277, 297	Slavkovic M.	170, 171, 172
Pejkova L.	154	Slavkovska J.	40
Pilić J.	112	Slavkovska V.	199
Pilipović A.	35	Smilkov K.	126, 285
Pipić-Kosanović M.	28	Šobajić S.	209
Piponski M.	82, 83, 84, 86	Sokolić M.	28
Poceva Panovska A.	7, 9, 11, 13, 15, 60, 318, 320, 323	Sorrentino R.	194
Poposka Z.	52	Spaseska M.	215
Popović-Grle S.	141	Spasevska M.	25
Popovska E.	23, 140, 151, 153, 246	Spasovska M.	129, 167, 169
Popovski E.	334, 342	Spiroski I.	159
Popovski M.	248	Srbinska M.	204
Poprzen V.	247	Stafilov T.	215, 219
Popstefanova N.	253, 254, 283	Stamatoski B.	248
Poša M.	35, 210	Stanic S.	106
Potpara Z.	263	Stanisavljević D.	195
Protić A.	51	Stanisavljević G.	121
		Stanković M.	262
		Stanković M.	263
		Stanković M.N.	156
		Stanojević Lj.	262
		Starkoska K.	39, 40, 52
		Stefanoska A.	161
		Stefanova B.	268, 272, 280
		Stefanovic N.	329
		Stefanovski D.	39
		Stefkov Gj.	177, 181, 183, 210, 212, 215, 217, 218, 219
		Stefkova M.	304
		Stefova M.	210, 217
		Sterjev Z.	42, 109, 111, 113, 115, 325,
		Sterjeva T.	309
		Sterjevska S.	26, 254, 287
		Stoimenova A.	154
		Stojadinović Maleska S.	106, 108
		Stojakov P.	170, 171
		Stojanovic S.	21
		Stojanovska A. N.	79, 235, 291
		Stojanovska E. K.	54, 74, 209,
		Stojanovska N.	31
		Stojevska M.	287
		Stojkovska K.	136
		Stoycheva L.	154
		Strezovska M.	32
		Štrukelj B.	124
Q			
Qendro G.	118		
Quazimi B.	215		
R			
Radakovic L.	119		
Radišić M.	51		
Radovanovic			
Velickovic R.	329		
Rafajlovska V.	184		
Rakić T.	45, 46		
Randelović N.	195		
Raščan - Mlinarič I.	356		
Ristevska E.	265, 292, 299		
Ristić M.	195, 199		
Rojecky - Bach L.	360		
Rombaut B.	356		
Rusevska T.	82, 83, 84		
Ruskovska T.	144, 197		
S			
Sabo A.	101		
Sakač M.	206		
Saliasi V.	328		
Salihila J.	203		
Samarova-Stoev B.	29, 38		

Sunaric S.	21	Živković J.	330
Suturkova Lj.	42, 109, 115, 318, 320, 323, 325, 336, 346	Živković J.V.	51
Szkultecka Debek M.	95	Zlatanovska S.	98
T		Zlatkov Al.	587
Tanovska N.	42	Žuntar I.	341
Tarifa D.	328		
Tasic Lj.	101		
Tasić-Kostov M.	262		
Todorov K.	154		
Todorovski M.	33		
Tomevska R.	142		
Tomić S.	28, 99		
Tomovska E.	313		
Tonic Ribarska J.	7, 9, 11, 13, 15, 42, 60, 63		
Tosevska K.	98		
Toshev K.	235, 274		
Toska Papajani V.	200		
Toska V.	194, 257		
Toti F.	97		
Trajchuleski M.	87		
Trajkoska Dabevska S.	254, 283		
Trajkova K.	311		
Trajkovic Jolevska S.	7, 9, 11, 13, 15, 42, 63, 68		
Troja E.	194, 201		
Trombeva D.	140		
Truban Žulj R.	28		
Tsvetanov B. Ch.	204		
Tšumová L.	189, 191		
U			
Ugarkovic S.	54, 66, 74, 209, 235, 268, 272, 274, 277, 280, 291		
Ugrinova L.	7, 9, 11, 13, 15, 57, 60, 77, 163		
V			
Valkova I.	340		
Vallebona Sinibaldi P.	194		
Vecerkov Vukmirovic S.	270		
Veleska Ivanovska J.	26		
Velickova N.	147		
Veličković D.	195		
Velikinac I.	47		
Velimirović D.	140		
Velinovska-Cadinovska M.	248		
Veljanova Z.	259		
Vemić A.	45, 46		
Veselinović, A.M.	51		
Vidović B.	150		
Vitezić D.	94		
Vitkova A.	193		
Vitnik Ž.	341, 348		
Vitnik V.	341, 348		
Vlacho B.	113		
Vlajin D.	51		
Vojnović T.	330		
Vovk I.	37		
Vujić Z.	20		
Vuličević I.	171		
Vulovska B.	83, 84		
Vunjak N.	171		
Z			
Zahariev I.	87		
Zareski R.	109		
Zečević M.	20		
Zezelic S.	99		
Zhelev I.	193		
Žigic G.	247		
Živanović Lj.	51		

АЦЕРОЛА АЛКАЛОИД®

таблети
за цваќање



Природен витамин Ц

- ✓ Единствен природен извор на здравје
- ✓ Го јакне имунитетот
- ✓ Моќен антиоксиданс
- ✓ Без додаток на шеќер



АЛКАЛОИД
СКОПЈЕ

Здравјето ѝ пред сè

www.alkaloid.com.mk

*Пред употреба внимателно да се прочита упатството.

За индикациите, ризикот од употребата и несаканите дејства на лекот обратете се кај Вашиот лекар или фармацевт.



BRONLES®

carbocisteine

го *олеснува*
искашлувањето и дишењето



Се препорачува кај деца и кај возрасни при:

- Заболувања на респираторниот систем кои се проследени со обилен секрет
- Воспаление на средното уво
- Воспаление на синусите

Пред употреба, внимателно да се прочита упатството!
За сите дополнителни информации, консултирајте се со Вашиот лекар или фармацевт.



АЛКАЛОИД
СКОПЈЕ

caffetin **COLDmax**[®]

максимален ефект
во ублажување на
симптомиште на
настинка и грип,
со **шојла најивка**



- ✓ КАЈ ГРИП И НАСТИНКИ
- ✓ НАМАЛУВА ТЕЛЕСНА ТЕМПЕРАТУРА
- ✓ НАМАЛУВА БОЛКИ
- ✓ НАМАЛУВА СЕКРЕЦИЈА ОД НОС


АЛКАЛОИД
СКОПЈЕ

ОРАЛЕН
ТРЕТОГЕНЕРАЦИСКИ
ЦЕФАЛОСПОРИН

TR IC EF

cefprozime

СУПЕРИОРЕН ВО ТЕРАПИЈА НА
РЕСПИРАТОРНИ ИНФЕКЦИИ

соодветен за сите возрасти

** моќен * докажан * безбеден*



АЛКАЛОИД
СКОПЈЕ

Здравјето ѝ пред сè

www.alkaloid.com.mk

ПОВЕЌЕ ОД МОЌНА КОНТРОЛА
НА КРВНИОТ ПРИТИСОК...

WALZERA
valsartan

... СУПЕРИОРНА КАРДИОПРОТЕКЦИЈА




**АЛКАЛОИД
СКОПЈЕ**

Здравјето ѝ пред сè

www.alkaloid.com.mk

Не се сите "сартани" ИСТИ



ЕУРО-ФАРМ

ул. Огњан Прица 5, Скопје;
тел-02/32-12-700; факс-02/32-14-292;
www.eurofarm.com.mk



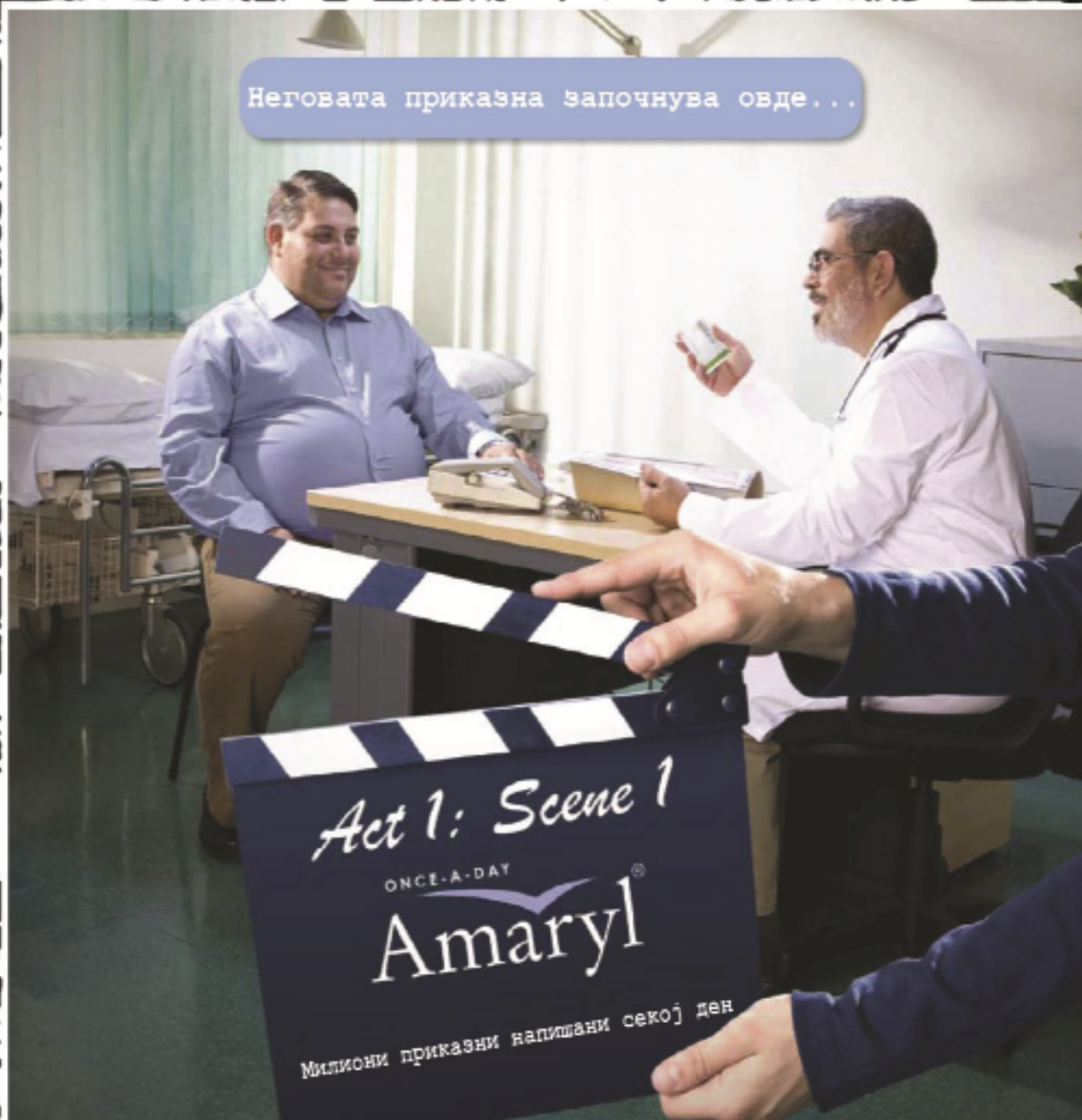
БРЗО ОПОРАВУВАЊЕ ОД КАШЛИЦАТА



НОВО
АЦЦ® 600
само еднаш на ден

АЦЦ се користи за лекување на акутни и хронични заболувања на дишните органи, пропратени со густ и вискозен секрет. АЦЦ брзо ја намалува густината на секретот, со што го олеснува неговото исфрлање. АЦЦ е безбеден за употреба кај деца и возрасни.

Неговата приказна започнува овде...



- Дозирањето еднаш дневно овозможува 24-часовна физиолошка контрола на гликемијата⁽¹⁾
- Подобрена контрола со додавање на метформин кај неконтролираните пациенти^(2, 3)
- Значително помалку хипогликемии и неутрален ефект на телесната тежина^(4, 4)
- Значително помал ризик од кардиоваскуларни инциденти во однос на глибенкламид⁽⁵⁾

References:

- (1) Sonnenberg GL et al. Ann Pharmacother. 1997;31(8):671-6.
- (2) Charpentier G et al. Diabetes Medicine 2001;18 (10): 828-34.
- (3) Gonzalez-Delir M, et al. J Diabetes Complications. 2008.
- (4) Wolgast H, et al. Diabetes Res Clin Pract. 2003; 61(1):13-9.
- (5) Klempig H, et al. Euro Hear J. 1999;20:439-446.

За повеќе информации обратете се на:
SANOFI AVENTIS MAKEDONIA d.o.o.,
Лозница 5, 1000 Скопје, Македонија
тел. +389 (0)2 421 4242

ЕДИНШ ДНЕВНО

Amaryl[®]
glimepirid

sanofi aventis

Because health matters

Милиони приказни напишани секој ден