UDC 615
661.12

ISSN 1409 - 8695

Македонски Фармацевтски Билтен

Macedonian Pharmaceutical Bulletin

СПИСАНИЕ НА МАКЕДОНСКОТО ФАРМАЦЕВТСКО ДРУШТВО • JOURNAL OF THE MACEDONIAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION

Макед. фарм. билт., **47,** (1,2) с. 1-56, 2001 Скопје
Maced. Pharm. Bull., **47,** (1,2) pp. 1-56, 2001 Skopje

Почитувани,

Ве известуваме дека ***Македонски фармацевтски билтен***, списанието на Македонското фармацевтско друштво, ќе печати трудови на англиски и на македонски јазик, и тоа оригинални научни трудови, куси соопштенија и прегледи на англиски јазик, а стручни трудови на македонски или на англиски јазик. Трудовите ќе бидат подложени на двојна рецензија од врвни стручњаци од соодветните области од земјата и од странство. Во тек се активностите за регулирање на статусот на Списанието во базата Chemical Abstracts и за перманентно цитирање во него.

Ве поканuваме да придонесете во подигањето на научното и на стручното ниво на единственото списание од областа на фармацијата од нашата земја со приложување на Ваши трудови, подготвени во согласност со пропозициите на Списанието кои ќе ги најдете на последните страници од ова списание.

Уредувачки одбор

Macedonian pharmaceutical bulletin, **47** (1,2) 3-8 (2001)
ISSN 1409 - 8695
UDC: 015.911: 615.451.21

Original scientific paper

Midazolam-sirupus, formulation and pharmacodynamic efficacy

K. Goracinova[1]*, K. Mladenovska[1], O. Gelevska[1], E. Fredro-Kumbaradzi[1], M. Glavaš-Dodov[1], J. Nanceva[2]

[1]*Institute of Pharmaceutical Technology, Department of Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, SS Cyril and Methodius University, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Republic of Macedonia*
[2]*Clinic for Orthopedic Diseases, Clinical Center at the Faculty of Medicine, SS Cyril and Methodius University, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Republic of Macedonia*

Received November 2001; accepted March 2002

Abstract

Due to its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties (sedation, amnesia and relief of anxiety) Midazolam has become a commonly used agent for conscious sedation of children before diagnostic or therapeutic procedure or before induction of anesthesia. Considering the advantage of oral administration to avoid the additional trauma of starting an IV in the child, and the fact that there is no adequate dosage form (Midazolam - Syrupus) on the drug market in our country, the aim of the presented work was to formulate syrupus using syrupus base/aqueous solution of viscosity enhancer - HPMC, in combination with suitable sweetener, flavor, and preservatives, and to evaluate its quality and stability. The pharmacodynamic efficacy/sedative effect of Midazolam HCl - Syrupus formulation was evaluated in 33 pediatric patients comparing this with the efficacy of intramuscularly administered Midazolam HCl (35 pediatric patients) in accordance with the Ramsay scale for analgosedation.

The formulation manifested good quality in respect to physical properties, physico-chemical parameters (pH value, relative density, drug content, ingredients content) antimicrobial efficacy and microbiological quality according to Ph Eur 3. In the conditions characteristic of the second (II) climate zone, the dosage form was stable for four months. The sedative effect of orally administered Midazolam was manifested in a period necessary for surgical premedication (30 - 45 min). The majority of patients (71%) entered the second phase on the Ramsay scale, when Midazolam was administered in a dose of 0.40 mg/kg.

Key words: Midazolam, syrupus, formulation, quality control, sedative efficacy

Introduction

Anxiolysis with drugs and psychoprophylaxis are both recognized methods of preoperative preparation. Benzodiazepine Diazepam is used for sedation. However, the short-acting benzodiazepine Midazolam has potential advantages over Diazepam. Due to its unique chemical structure (1,4-benzodiazepine derivative) depending on environmental pH, the drug can produce highly water-soluble salts (pH less than 4) or exist in lipophylic diazepine ring-closed form (pH greater than 4). The pH dependence of the opening or closure of a ring in Midazolam's molecular structure suggests a pH dependence of the mucosal absorption. Thus, a significant amount of orally administered Midazolam may be absorbed by the mucosal membranes in the oral cavity, esophagus, and the stomach (1). This contributes to a rapid onset of action and to good clinical tolerance. After both oral and intramuscular administration, Midazolam has a fast absorption rate and is rapidly excreted, with a half-life of only about 2 hours. A reasonably good correlation has been found between plasma levels and clinical effects, indicating a fast, but brief response. In anesthesiology, Midazolam appears to be a useful, short-acting, sedative-anxiolytic and amnesic premedication after both oral and parenteral administration. Its advantages include good cardiovascular stability, transient and mild respiratory depression, low frequency of venous irritation,

*katerina.goracinova@baba.ff.ukim.edu.mk
phone. + 389 02 126 032; 119 694; fax: + 389 02 123 054

production of anterograde amnesia and short duration of action in comparison with other benzodiazepines (2 - 3).

Until recently, only the intravenous form of the drug was available. Environment or frightened parents together with additional trauma of starting an IV in the child were overwhelming for the child. Many practitioners used the IV preparation for oral administration to avoid the additional trauma. However, the liquid was very bitter even with added flavoring. So, one of the methods of reducing anxiety for a pediatric patient was oral Midazolam (4).

A comparative study of heart rate (HR), blood pressure (BP) and norepinephrine, epinephrine and cortisol levels in two groups of children, one receiving psychological treatment only, and the other receiving 0.2 mg/kg Midazolam orally, showed that HR, BP, as well as humoral stress parameters indicate that Midazolam in a recommended dose is sufficient to reduce preoperative stress in children (5). Comparing the preoperative sedative effects and the postoperative recovery profiles of two oral premedicants: Midazolam (0.5 mg/kg) and a combination 0.2 ml/kg of Meperidine (6 mg/ml), Atropine (0.08 mg/ml), and Diazepam (0.6 mg/ml), it was concluded that the majority of children in both groups achieved acceptable separation and induction scores. However, the Midazolam subjects showed significantly better improvement in scores at both separation and induction (6).

The research activities of Tolksdarf, Eick and Riva et al. (7 - 8) considering the efficacy of Midazolam administered rectally, orally and nasally in pediatric patients confirmed that oral administration is well accepted and more effective than other ways of administration. Special consideration should be taken only in respect to the adverse effects. The nasal administration of Midazolam should be avoided as a routine in premedication of pediatric patients because of legal acceptability.

In November 1998, the FDA approved Versed Syrup, a flavored liquid that contains an artificial bitterness modifier. Syrup is indicated for use in pediatric patients for sedation, anxiolysis and amnesia prior to diagnostic, therapeutic or endoscopic procedures or before induction in anesthesia. The recommended dose for children is a single dose of 0.25 to 0.5 mg/kg to a maximum dose of 20 mg. Younger children (6 months to less than 6 years) and less cooperative children may require a higher dose of up to 1 mg/kg. In obese children the dose should be calculated based on ideal body weight. The dose should be individualized for the patient's age, level of anxiety and medical need. The time of onset is usually within 10 to 20 minutes. The relationship between plasma concentration and sedation and anxiolysis scores of oral Midazolam syrup (single oral doses from 0.25 - 1.0 mg/kg) in three age groups (6 months to < 2 yrs, 2 to < 12 yrs, and 12 to < 16 yrs) showed that the mean Midazolam plasma concentration as well as the mean of Midazolam plus alpha - hydroxymidazolam (pharmacologically active metabolite) plasma concentration for those patients with a sedation score of 4 (asleep but responsive to mild shaking) is significantly different from the mean concentrations for those with a sedation score of 3 (drowsy), which is significantly different from the mean concentrations for patients with a sedation score of 2 (awake/calm). The statistical analysis indicated that the greater the Midazolam, or Midazolam plus alpha-hydroxymidazolam concentration, the greater the sedation score for pediatric patients. No such trend was observed in anxiolysis, which is a more variable surrogate measurement of clinical response.

Several investigators have worked on formulation and stability evaluation of Midazolam-Syrupus using Midazolam for IV administration. Steedman and co-workers (9) have researched the stability of a peroral solution of Midazolam prepared from IV taste-modified Midazolam formulation and stored at different temperatures. All the examined parameters (physical, physico-chemical, microbiological, drug content) showed stability at a decreased and increased temperature. A similar formulation prepared by Walker et al. (10) showed stability over 102 days under similar conditions.

Considering the advantages of Midazolam and of oral administration in the form of syrup, also, and the fact that no such formulation is available on the market in our country, as an aim of the study we formulate Midazolam Syrupus using a contemporary approach in designing the syrup preparations. In other words, an aqueous solution of hydroxypropyl methylcellulose was used as a syrup base due to its adequate viscosity. The characterization of the formulation includes physical and physico-chemical parameters, microbiological quality and the antimicrobial efficacy of the preservative used. The stability of the formulation was also periodically evaluated through the physical and physico-chemical parameters and microbiological quality. The effectiveness of this formulation as a premedicant to sedate and calm pediatric patients prior to induction of general anesthesia was evaluated in a randomized, double-blind, parallel-group study comparing an other group, in which Midazolam was intramuscularly administered.

Materials and methods

Materials

The following materials were supplied from commercial sources: Midazolam (Roche, USA), Sodium benzoas p.a. (Alkaloid, Macedonia), Saccharin Sodium (Merck, Germany), Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)-Metocel E15 (Hercules, USA).

Midazolam-Syrupus formulation

The contemporary approach in formulating the syrup includes the following materials and steps:

Midazolam		0.10
Sodium benzoas		0.22
Saccharin Sodium		0.18
Flavor-banana		0.10
HPMC (aqueous sol. 3 % w/V)	ad	100.00 ml

Midazolam is solubilized in an aqueous medium with a presence of 0.1 mol/L HCl to form a solution in which each ml contains Midazolam HCl equivalent to 1 mg Midazolam. The presence of 0.1 mol/L HCl induces acidity in a range of 3.90 - 3.95 in which an equilibrium between diazepine ring -closed and ring-opened form exists (reversible forming) due to the acid catalyzed opening of 4,5 double force of diazepine ring. Bioavailability studies (1) of commercially available Midazolam syrupus for oral administration with a pH of 2.8 to 3 suggest that the absorption from the syrup may be significantly improved by slightly increasing the pH. In a physiological pH open-ring form transforms into physiologically active lypophilic closed-ring form.

Such a solution, together with Sodium benzoas, Saccharin Sodium and flavor are added to a previously prepared aqueous solution of HPMC (3 % w/V). Sodium benzoas as a preservative is active in a pH range of 2 - 5.

Physico-chemical characterization of Midazolam-Syrupus

Physical properties, such as color, odor, taste and transparency were tested. For determining the color changes semiquantitative analysis was performed using spectrophotometry in visible wavelength.

pH value was determined according to the method proposed by Ph. Eur. 3 (potentiometric determination, pH meter MA 5705, Iskra-Kranj).

The viscosity was determined using a Brookfield rotating viscometer, according to the method proposed by Ph. Eur. 3 (50 rpm Brookfield model P1.2M. 2010 Shanon Ireland).

The relative density was also determined according to the method proposed by Ph. Eur. 3 (pycnometric).

Drug content in Midazolam-Syrupus

Midazolam content was determined using the HPLC technique (Perkin Elmer, pump: Serie 200LC, auto sampler: ISS-200, Detector: 785A UV/VIS) with acetonitrile and buffer-potassium dihydrogen phosphate (70:30) as mobile phase (2.0 ml/min at 35 ^{0}C and 275 nm for Midazolam). The contents of other ingredients, such as Sodium Benzoas and Saccharin Sodium, were also determined using the same technique.

Microbiological analysis of Midazolam-Syrupus

The method proposed in Ph. Eur. 3 for the microbiological quality of a non-sterile preparation was used in determining the microbiological quality of Midazolam Syrupus formulation. Adequate microbiological methods were used for the detection and quantifying of the following bacteria: *Salmonella, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Staphylococcus aureus,* fungus and mold. According to the Ph. Eur. 3 regulations, 1 ml of the sample may contain 10^4 aerobic bacteria, 10^2 fungus and 10^2 other enterobacteria. The presence of the above-mentioned bacteria is not allowed.

Antimicrobial efficacy of the preservative, Sodium benzoate, used in Midazolam-Syrupus formulation

The evaluation of antimicrobial efficacy of the preservative was made according to the method proposed by Ph. Eur. 3 using standard inoculums of separate suspensions of Pseudomonas aeruginosa and Candida albicans (10^8/ml micro-organisms according to the Mc Farland standard). 10 ml of the preparation were inoculated with 0.1 ml bacterial suspension and the number of microorganisms was counted in blood-agar medium over a period of 14 and 28 days.

Stability evaluation of Midazolam Syrupus

Stability evaluation was performed by maintaining the formulation at temperatures of 2 - 8 ^{0}C and 26 + 0.5 ^{0}C over a period of 4 months, while at 37 ^{0}C the preparation was maintained over a period of one month. Physical and physico -chemical parameters, drug content, ingredients contents and the microbiological quality were determined periodically in the 1st, 3rd and 4th month of syrup preparation.

Sedative efficacy of Midazolam-Syrupus

The dynamic and quality of sedation of Midazolam (intramuscularly and perorally administered) were investigated in 68 children (ASA Physical Status 1 and 2; aged 1 - 13 yrs) submitted to orthopedic operative treatment at the Clinic for Orthopedic Disease at the Clinical Center in Skopje. The first group of 35 children (Group 1) was treated with Midazolam intramuscularly administered in a dose of 0.15 - 0.2 mg/kg, while to the second group of 33 children (Group 2) Midazolam was administered perorally in a form of prepared syrup and in a dose of 0.4 mg/kg.

The sedative efficacy was followed according to the Ramsay scale of analgosedation (1. frightened, agitated; 2. slightly sedated, oriented; 3. response to commands only; 4. prompt response to slight stimulation; 5. delayed response to slight

stimulation; 6. no response to stimulation) within 10, 20, and 30 minutes of administration considering the time necessary for preoperative treatment (30 - 45 minutes).

Results and discussion

The Midazolam-Syrupus prepared is a clear, colorless, banana flavored liquid that contains Saccharin Sodium as an artificial bitterness modifier. The Syrupus contains 1 mg Midazolam per 1 ml. The results conserning the physico-chemical parameters at the time of preparing the formulation are presented in Table 1.

In respect to the microbiological quality and preservative activity of Sodium benzoate the formulation is in accordance to the standards proposed by the Ph. Eur. 3. The formulation prepared contains less than 10^4 aerobic bacteria, 10^2 fungus and 10^2 other enterobacteria. The presence of *Salmonella, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Staphylococcus aureus* was not registered.

The criterion of acceptance of the preservative efficacy was the reduction of living microorganisms (log value) regarding their total number in inoculums. The following log values are adequate for the microorganisms of interest according to the Ph. Eur. 3 (3 for bacteria and 1 for fungus during 14 days without increase in their growth during the 28 days). Considering the Midazolam-Syrupus formulation, the criteria for the success of preservative used, Sodium benzoate, were satisfied.

There were no changes in the physical properties of the Midazolam-Syrupus over the 4 months at the temperatures investigated; 2 - 8 ^{0}C and 26 + 0.5 ^{0}C. The physical status of the formulation was not changed, either, after 1 month of maintaining at 37 ^{0}C. Due to the instability of flavor under the conditions of the stability test, its evaluation was performed at room temperature.

As Table 2 shows there are no significant changes in the physico-chemical properties of the Midazolam-Syrupus formulation in a period of 1 month after maintaining the formulation at 2 - 8 ^{0}C and 26 + 0.5 ^{0}C. There are not any changes in the microbiological quality of this preparation, either, in the same period at all temperatures investigated. By maintaining the formulation at a temperature of 37 ^{0}C, significant changes in Midazolam HCl content can be observed in the same period of study. This indicates the necessity of providing the conditions for maintaining the quality of the preparation if the temperature deviates from the middle temperature for the 2nd climate zone (25 ^{0}C).

As Table 3 indicates there are not any significant changes in the physico-chemical properties of the Midazolam-Syrupus formulation after 4 months of studies after maintaining the formulation over a period of 4 months at 2 - 8 ^{0}C and 26 + 0.5 ^{0}C. The microbiological quality of the formulation was also in accordance to the standards proposed by the Ph. Eur. 3.

Table 1. Physico-chemical parameters of Midazolam-Syrupus formulation

Physico-chemical parameter	Midazolam -Syrupus ± SD (n = 3)
pH	3.96 ± 0.06
Relative density (kg/m^3)	1.00 ± 0.03
Viscosity (mPa · s)	38.00 ± 0.07
Midazolam content (%)	101.30 ± 0.07
Sodium Benzoas content (%)	99.80 ± 0.05
Saccharin Sodium content (%)	100.00 ± 0.08

The majority of patients receiving Midazolam in the form of Syrupus entered the 2nd phase of the Ramsay scale in a period of 20 - 30 minutes, by which the basic principles of surgical premedications are fulfilled. Although intramuscular application causes faster (15 - 20 minutes) and more intensive clinical response (percent of patients entering the 2nd phase of the Ramsay scale is higher; 80 vs. 71%), oral premedication can successfully replace intramuscular administration (Fig. 1). Considering the percentage of patients, who did not enter the second phase of the Ramsay scale (20 % in Group 1, and 29 % in Group 2) it can be concluded that the quality and dynamic of sedative efficacy are strictly individual and depend on the general condition of the patient and level of anxiety, which is especially emphasized in pediatric patients.

Table 2. Physico-chemical parameters of Midazolam-Syrupus formulation after 1 month of stability studies

Physico-chemical parameter	Measured parameters of different temperature of storage of Midazolam-Syrupus ± SD (n = 3)		
	2 - 8 ^{0}C	26 ± 0.5 ^{0}C	37 ^{0}C
pH	3.95 ± 0.04	3.94 ± 0.05	3.96 ± 0.05
Relative density (kg/m^3)	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.07
Viscosity (mPa · s)	38.00 ± 0.08	38.00 ± 0.07	38.00 ± 0.06
Midazolam content (%)	100.00 ± 0.07	101.30 ± 0.08	86.00 ± 0.06
Sodium Benzoas content (%)	99.70 ± 0.05	98.98 ± 0.06	99.00 ± 0.08
Saccharin Sodium content (%)	98.85 ± 0.08	98.85 ± 0.08	98.93 ± 0.09

Table 3. Physico-chemical parameters of Midazolam-Syrupus formulation after 4 months of stability studies

Physico-chemical parameter	Measured parameters of different temperature of storage of Midazolam-Syrupus ± SD (n = 3)	
	2 - 8 ^{0}C	26 ± 0.5 ^{0}C
PH	3.96 ± 0.04	3.99 ± 0.05
Relative density (kg/m^3)	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.05
Viscosity (mPa · s)	38.00 ± 0.07	38.00 ± 0.06
Midazolam content (%)	99.30 ± 0.09	98.38 ± 0.08
Sodium Benzoas content (%)	98.30 ± 0.05	99.00 ± 0.06
Saccharin Sodium content (%)	93.36 ± 0.08	98.81 ± 0.07

No adverse effects, such as respiratory depression, airway obstruction, oxygen desaturation or apnea occurred during the clinical study with Midazolam- Syrupus at the dose administered.

Conclusion

The Midazolam-Syrupus formulation manifested good quality in respect to physical and physico-chemical parameters (pH value, relative density, drug content, ingredients content), antimicrobial efficacy and microbiological quality according to Ph. Eur. 3. In the conditions characteristic of the second (II) climate zone, the dosage form was evaluated over 4 months and maintained stability during this period of study. If the temperature deviates from the middle temperature of the second (II) climate zone it is necessary for adequate storage conditions to be provided.

Oral premedication can successfully replace intramuscularly administration in pediatric patients; special consideration should be taken in respect to the general condition of the patient and the level of anxiety; thus the doses should be individually adjusted. The recommended dose is in a range of 0.25 to 1.0 mg/kg for preprocedural sedation and anxiolysis in pediatric patients. It should be used only in hospital or ambulatory care settings, including physicians' and dentists' offices, that are equipped to provide continuous monitoring of respiratory and cardiac function.

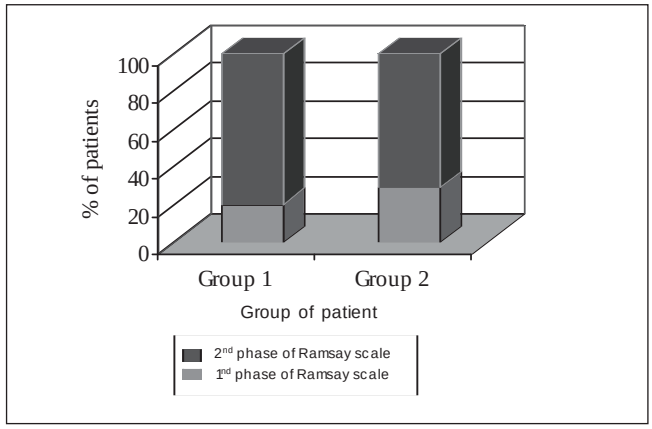


Fig. 1. Sedative efficacy of Midazolam, administered intramuscularly (Group 1) and perorally (Group 2)

References:

1. J. Zhang, S. Nin, H. Zhang and J.B. Streisand, *J Pharm Sci* 91 (4) 980-2 (2002)
2. J.J. Horgesheimer, *Pediatr. Dent.* 23 (6), 491-4 (2001)
3. J.H. Kanto, *Pharmacotherapy* 5 (3), 138-55 (1985)
4. J. Walker, *Accident&Emergency Nursing*. 4 (3), 110-3 (1996)
5. U. Burkhardt, L. Wild L, B. Vetter and D. Olthoff, *Anesthesist.* 46 (10), 850-5 (1997)
6. C.A. Pywell, YJ. Hung and J. Nagelhout, *AANA Journal*. 63 (2), 124-130 (1995)
7. W. Tolksdof and C. Eick, *Anaethesist* vol 40, Jss 12, 661-667 (1991)
8. J. Riva, G. Jejbusiewicz, M. Papa, C. Jauber, W. Kohn and M. Da Fonte, *Paediatric Anaesthesia* 7 (3), 191-6 (1997)
9. S.I. Steedman, J.R. Koonce, J.E. Wynn and N.H. Brahen, *Am. J. Hosp. Pharm.* 49 (3), 616-618 (1992)
10. S.E. Walker, H.A. Grad, D.A. Naas and A. Mayer, *Anesth. Prog.* 44 (1), 17-22 (1997)

Резиме

Мидазолам сируп, формулација и фармакодинамско дејствување

[1]К. Горачинова, [1]К. Младеновска, [2]О. Гелевска, [1]Е. Фредро-Кумбараџи, [1]М. Главаш-Додов, [2]J. Нанчева

[1]Институт за фармацевтска технологија, Катедра за биофармација, Фармацевтски факултет, Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија

[2]Клиника за ортопедски болести, Клинички центар, Медицински факултет, Водњанска 17, 1000, Скопје, Р. Македонија

Клучни зборови: мидазолам, сируп, контрола на квалитет, седативен ефект

Мидазоламот како средство за премедикација при хируршки интервенции, болни дијагностички и терапевтски процедури се користи кај пациенти кои припаѓаат на различни возрасни групи. Особено кај педијатриските пациенти е поволна неинвазивна примена при опишаните индикации. Лековитите супстанции наменети за седација инкорпорирани во соодветен дозажен облик треба ефикасно да дејствуваат и да го сведат на минимум негативниот психолошки одговор, физичката нелагодност и болката. Имајќи го ова предвид, како и непостоењето течна дозирана форма/сируп на мидазолам во нашата земја, поставени беа следниве цели: формулирање сируп (преведување на мидазоламот во растворлива форма за постигнување на потребната концентрација во препаратот, при што како сирупна база беше користен воден раствор на средство за зголемување на вискозноста – HPMC, во комбинација со вештачки засладувачи и конзерванси); контрола на квалитетот (физички и физичко-хемиски параметри, микробиолошки квалитет, антимикробна ефикасност на конзервансот, стабилност) и испитување на фармакодинамската ефикасност на сирупот со мидазолам хидрохлорид (следена кај 33 педијатриски пациенти во споредба со ефикасноста на интрамускулно аплицираниот мидазолам хидрохлорид кај 35 пациенти со користење на Ramsay скалата за аналгоседативниот ефект).

Формулацијата покажа задоволителен квалитет во однос на физичките својства, на физичко-хемиските параметри (pH, индекс на рефракција, релативна густина, квантитативна содржина) и микробиолошкиот квалитет во согласност со Ph. Eur. 3. Препаратот е испитуван и стабилен е во текот на четири месеци на ниски температури (2 - 8 ^{0}C) и во услови на втората климатска зона (26 ± 0,5^{0}C). Седативниот ефект по апликацијата на сирупот се јавува во периодот потребен за хируршка премедикација (30-45 минути), постигнувајќи го ефектот на втората фаза на Ramsay скалата во дози од 0,40 mg/kg.

Macedonian pharmaceutical bulletin, **47** (1,2) 9-14 (2001)
ISSN 1409 - 8695
UDC: 582.929.4:547.9720..497.71

Original scientific paper

Determination of flavones in species of *Thymus* L. (Lamiaceae) from Macedonian flora

Svetlana Kulevanova[1]*, Marina Stefova[2], Tatjana Kadifkova Panovska[1], Jasmina Tonic[1], Trajce Stafilov[2]

[1] *Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, R Macedonia*
[2] *Instute of Chemistry, Faculty of Science, P. O. Box 162, 1000 Skopje, R Macedonia*

Received October 2001; accepted March 2002

Abstract

Assay of flavonoids in extracts of seven *Thymus L.* (Lamiaceae) species from Macedonia including identification and quantification was performed. Extracts obtained after hydrolysis of air dried samples (A_1) were analyzed by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). Luteolin and apigenin were identified in comparison to authentic standard substances. The content of total flavonoids in plant samples determined by UV-Vis spectrometry (with $AlCl_3$) ranged from 0.05-0.13 %. Two other extracts were prepared by extraction with a mixture of ethanol:water (7:3, V/V), evaporation until only water remained and extraction first with diethylether (A_2) and secondly with ethyl acetate (A_3). The content of flavonoids in diethyl-ether and ethyl acetate extracts ranged from 52.5-244.4 $mg \cdot ml^{-1}$ and 48.7 -117.5 $mg \cdot ml^{-1}$, respectively. For quantification of luteolin and total flavonoids the HPLC method was applied, using reverse phase column C18, mobile phase consisting of 5% acetic acid and methanol in gradient elution mode and column temperature set to 40 ^oC. The content of luteolin in the plant samples ranged from 0.23-0.48 % (m/m), while the content of total flavonoids was found to be 0.26-0.52 %.

Key words: *Thymus,* flavones, identification, determination, HPLC analysis

Introduction

Certain biological and pharmacological effects of the *Thymus* species have been experimentally proved, such the expectorant (1), spasmolytic (1-3), antibacterial (1,4), antifungal (5), antioxidant (6-9), *etc*. These activities are due to the specific composition of the essential oils (1, 4-9), flavonoids (1-3, 9), phenolic acids (4) and other chemical constituents of *Thymus*.

Beside the data concerning the composition of the essential oils, a lot of literature data about *Thymus* also consider information about the flavonoids present in this species. A very comprehensive work is presented in the papers of Spanish authors where the distribution of flavone aglycones in a number of *Thymus* species is given (10-15). The flavonoids have also been investigated in representatives of Macedonian *Thymus* species, and luteolin, apigenin, diosmetin, eriodyctiol and naringenin were identified as free flavonoid aglycones in many of them (16-18).

In respect to the literature data, a lot of information on the identification and isolation of flavonoids is available, which cannot be said for quantitative data on these components of *Thymus*. Determination of their content could be important because the flavonoids are involved in spasmolytic, antioxidant and other activities of *Thymus sp*. The aim of the present study is to establish methods for determining the total flavonoid content as well as the content of the main flavone aglycones in Macedonian *Thymus* species.

*e-mail: svetlana.kulevanova@baba.ff.ukim.edu.mk
tel: 126-032, fax: 123-054

Experimental

Plant material

Aerial parts of the plant were collected in the flowering season during summer 1997 and 1998 in different parts of Macedonia. The material was air dried, packed in paper bags and kept in a dark and cool place until analysis. The identity of plant species was verified by Prof. Dr. V. Matevski from the Institute of Biology, Faculty of Science in Skopje as follows:

1. *Thymus tosevii ssp. tosevii var. tosevii* Vel.; Kichevo, western Macedonia, 1997
2. *Thymus tosevii ssp. tosevii var. longifrons* Ronn.; Mavrovo, western Macedonia, 1997
3. *Thymus tosevii ssp. tosevii var. degenii* Ronn.; Lazaropole, western Macedonia, 1998
4. *Thymus macedonicus* (Deg. et Ur.) Ronn.; Berovo, eastern Macedonia; 1998
5. *Thymus moesiacus* Vel.; Shar Planina, northern Macedonia, 1997
6. *Thymus alsarensis* Ronn.; Kozjak Mountain, southern Macedonia, 1998
7. *Thymus longidens var. lanicaulis* Vel.; Skopje, central Macedonia, 1998

Reagents and authentic samples

The reagents used were of highest purity (>99.95 purity), methanol HPLC grade, glacial acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany) and authentic samples of apigenin, luteolin, naringenin, eriodyctiol, chrysoeriol and diosmetin (Extrasynthese, Lyon, France).

Apparatus

A Perkin-Elmer UV-Vis spectrometer Lambda 16 for spectrometric measurements and a Varian HPLC system equipped with a ternary pump Model 9012 and UV-diode-array detector Model 9065 for liquid chromatography measurements were used.

Extraction procedure

Extract A_1. Plant material (1 g) was extracted with 60 ml acetone and 2 ml 25 % HCl in an erlenmeyer flask (with condensator) on a water bath with continuous mixing, 40 min. The mixture was then cooled, filtered and transferred to a 100 ml volumetric flask and the operation was repeated with 40 ml acetone, 20 min. After filtration in the same flask, it was filled with acetone to volume. 40 ml of the solution was transferred into a separating funnel, 50 ml of water was added and the extraction was repeated twice with 20 ml and a third time with 15 ml ethylacetate. The ethylacetate fractions were collected and washed three times with 50 ml of water each, then dried with anhydrous Na_2SO_4 for 30 min, filtered into a 50 ml volumetric flask and filled with ethylacetate to volume.

Extracts A_2 and A_3. 10 g of plant material were extracted with an ethanol : water mixture (7:3, V/V) at room temperature, with continuous mixing for 24 h. After filtration the solution was evaporated under low pressure until water remained only. The water phase was transferred into a separating funnel and extracted first with ether and then with ethylacetate. The obtained extracts, in ether and in ethylacetate, were evaporated to dryness and the residues were dissolved in 10 ml of methanol, giving the extracts marked A_2 and A_3, respectively.

The extracts A_1, A_2 and A_3 were used for identification (TLC) and determination of total flavonoids (by spectrophotometry).

Extract B: Plant material (2.0 g) was extracted with acetone and 2 ml 25 % HCl using the same procedure as described for extract A_1. A 25 ml portion of this acetone extract was transferred to a separating funnel. 50 ml of water was added and extraction with ethylacetate was repeated until a negative reaction on flavonoids was obtained (test with TLC in system S_1). The ethylacetate extracts were collected and washed three times with 100 ml of water, dried with anhydrous Na_2SO_4 for 30 min, filtered and evaporated to dryness under low pressure. The residue was dissolved in 10 ml of methanol and the solution was used for identification and determination of flavone aglycones by HPLC.

Identification of flavonoids

Flavone aglycones were identified by TLC and HPLC methods compared to authentic samples of flavonoids.

TLC. Commercial TLC aluminium sheets with Silica HF_{254} and the following mobile phases were used:

S_1: Toluene:EtAcO:HCOOH = 58:33:9 (*V/V*);

S_2: $CHCl_3$:MeOH = 97:3 (*V/V*);

S_3: Benzene:dioxane: AcOH = 90:25:4 (*V/V*).

The visualization of the spots was performed under UV light at 254 and 366 nm before and after spraying with $AlCl_3$ solution.

HPLC. A reverse phase column C18 (250 x 4.6 mm, 5 mm particles) was used. The mobile phase consisted of two solvents: 5 % CH_3COOH (A) and CH_3OH (B) and the elution program for screening the extracts was the following: 0-5 min 70 % A; 10-15 min 60 % A; 20-25 min 50 % A; 30-35 min 40 % A and 40-45 min 20 % A. The flow rate was 1.3 ml/min and the temperature was set to 30 °C. The elution was monitored at 254 and 348 nm.

Determination of flavonoids

Spectrophotometry: UV-Vis spectrophotometry was used for determination of total flavonoids. Luteolin was used for the construction of the calibration curve in the concentration range from 1.0-10.0 $mg \cdot ml^{-1}$. 10 ml of extract A_1 was transferred into a 25 ml volumetric flask, 1 ml 2% $AlCl_3$ was added and the solution was filled to volume with methanol-acetic acid. After 30 min the absorbance was measured at 390 nm against the same solution without $AlCl_3$ being blank.

The contents of flavonoids were determined in extracts A_2 and A_3. The whole procedure for obtaining the hydrolyzed

Table 1. TLC and HPLC identification of flavonoids in different *Thymus* species, after hydrolysis

	S_1*	S_2*	S_3*	t_R/ min (HPLC)
Extracts				
Thymus tosevii ssp. *tosevii* var. *tosevii* Vel.	0.28; 0.52; 0.63	0.32; 0.47; 0.58	0.38; 0.52; 0.73	4.10; 8.90; 15.43
Thymus tosevii ssp. *tosevii* var. *longifrons* Ronn.	0.28; 0.51; 0.62	0.32; 0.48; 0.58	0.38; 0.52; 0.72	4.15; 8.90; 15.50
Thymus tosevii ssp. *tosevii* var. *degenii* Ronn.	0.28; 0.52; 0.63	0.32; 0.46; 0.59	0.38; 0.52; 0.72	4.08; 8.72; 15.48
Thymus macedonicus (Deg. et Ur.) Ronn.	0.27; 0.51; 0.63	0.32; 0.47; 0.58	0.38; 0.51; 0.73	4.07; 8.90; 15.40
Thymus moesiacus Vel.	0.28; 0.52; 0.63	0.32; 0.46; 0.57	0.38; 0.50; 0.73	4.10; 8.93; 15.60
Thymus alsarensis Ronn.	0.26; 0.50; 0.61	0.32; 0.47; 0.59	0.38; 0.51; 0.72	4.12; 8.91; 15.50
Thymus longidens var. *lanicaulis* Vel.	0.27; 0.52; 0.62	0.32; 0.47; 0.58	0.38; 0.50; 0.72	4.10; 8.75; 15.40
Standard substances				
Luteolin	0.52	0.33	0.51	8.86
Apigenin	0.62	0.58	0.73	15.51
Diosmetin	0.58	0.61	0.85	17.22
Chryseriol	0.60	0.67	0.85	-
Caffeic acid	0.27	0.46	0.38	3.20

* *Rf* values of the spots; S_1: Toluene:EtAcO:HCOOH = 58:33:9; S_2: $CHCl_3$:MeOH = 97:3; S_3: Benzene:Dioxane:AcOH = 90:25:4 (*V/V*).

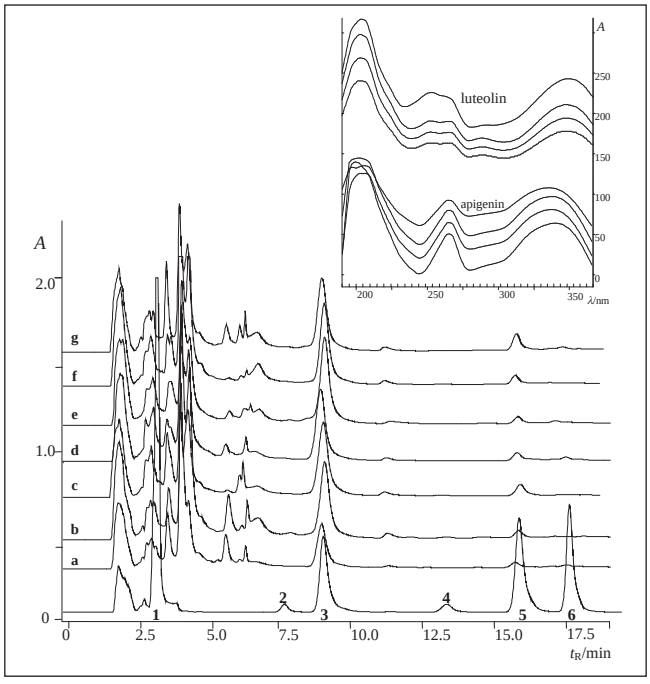


Fig 1. HPLC chromatograms of: mixture of standard substances and hydrolysed extracts of: a. *Thymus longidens* var. *lanicaulis*; b. *Thymus alsarensis*; c. *Thymus moesiacus*; d. *Thymus tosevii* var. *degenii*; e. *Thymus tosevii* var. *longifrons*; f. *Thymus macedonicus*, g. *Thymus tosevii* var. *tosevii*, with the UV-spectra of the dentified flavones luteolin and apigenin. (1-caffeic acid, 2-eriodyctiol, 3-luteoilin, 4-naringenin, 5-apigenin, 6-diosmetin)

extracts (described for A_1) was repeated taking 1 ml of the corresponding extracts, instead of 1 g of plant material.

HPLC. The experimental conditions were the same as those described for the identification. The same stationary and mobile phases were used, but the elution program for quantifying luteolin in the extracts was much shorter, as follows: 0-15 min 45 % A and 20-30 min 20 % A. The flow rate was 0.8 ml·min-1 and the temperature was set to 40 °C. The data acquisition was made at 348 nm. Calibration was made in the concentration range of 0.05-1 mg·ml^{-1} luteolin in methanol, or expressed in terms of mass of luteolin injected into the column from 1-20 μg luteolin (sample loop 20 μl).

Results and discussion

Identification of flavonoids

The flavone aglycones were identified in the extracts obtained after hydrolysis of flavone glycosides in drugs using HCl. The results of TLC and HPLC qualitative analysis are presented in Table 1.

Two dark violet spots were recognized under UV light (366 nm), which become clear yellow to orange-yellow after spraying with $AlCl_3$ solution. The *Rf* values of these spots in different solvent systems were very close to the ones obtained for authentic samples of luteolin and apigenin. The third light blue spot before and after spraying with $AlCl_3$ was identified as caffeic acid. The HPLC screening method confirmed the presence of a significant quantity of luteolin and a much smaller quantity of apigenin, which were identified according to the retention times and the UV spectra, compared to those for authentic samples (Fig. 1).

Determination of total flavonoids by spectrophotometry

The method is based on the formation of stable complexes of Al^{3+} ions with OH-groups in C-3 or C-5 position together with the carbonyl group in the γ-pirone ring of flavones and flavonols in a

acidic medium. The products of the reaction have maximal absorption at 425 nm in the case of flavonols and at 390 nm when flavones are present (19, 20). In our examination luteolin was used for the construction of a calibration curve in the concentration range from 1.0-10.0 μg·ml^{-1}. In this concentration range luteolin obeys Lambert-Beer's law with the following regression equation: A = 0.18c - 0.003 (r = 0.9999). The content of total flavonoids, estimated as luteoiln, was determined in the samples of herbal drugs as well as in ether and ethylacetate extracts of wild *Thymus* species. The obtained results are presented in Table 2.

coefficient of correlation are the following: area = 3.6884·10^5 *m*(luteolin), *RSD* = 3.67 %, *r* = 0.9991. The accuracy of the method was checked by the method of standard additions which showed a satisfactory accuracy (21), whereas the sensitivity of the method was determined by construction of a calibration curve in the low concentration region (0.1-1.0 μg) approximated as a detection and quantification limit. The regression equation of this curve was:

area = 4.1182·10^5 *m*(luteolin) with *SD* = 10802 and *r* = 0.9979. The limit of detection calculated as three times the ratio between the *SD* and the slope of the low concentration curve (DL =

Table 2. The content of total flavonoids in different samples of *Thymus* determined by spectrophotometry: drug samples (A_1); diethyl-ether extracts (A_2) and ethylacetate extracts (A_3)

	Sample	A_1 (%)	A_2 (mg·ml^{-1})	A_3 (mg·ml^{-1})
1.	*Thymus tosevii* ssp. *tosevii* var. *tosevii* Vel.	0.07	201.3	117.5
2.	*Thymus tosevii* ssp. *tosevii* var. *longifrons* Ronn.	0.08	52.5	91.25
3.	*Thymus tosevii* ssp. *tosevii* var. *degenii* Ronn.	0.10	128.8	52.5
4.	*Thymus macedonicus* (Deg. et Ur.) Ronn.	0.11	101.3	71.88
5.	*Thymus moesiacus* Vel.	0.08	244.4	64.6
6.	*Thymus alsarensis* Ronn.	0.13	240.6	48.7
7.	*Thymus longidens* var. *lanicaulis* Vel.	0.05	164.4	84.4

(n=5)

Low contents of total flavonoids can be noticed in each of the examined samples, ranging from 0.05 to 0.13 % (m/m). The fraction of flavonoids that passed into ether or ethylacetate extract is variable, but for most of the samples ether extracts contain a larger quantity of flavonoids (except for *T. tosevii* var. *longifrons*). This is probably due to the fact that Macedonian *Thymus* species contain many more free flavone aglycones in comparison to the content of glycosides.

HPLC determination of luteolin and total flavonoids

The HPLC screening analysis of extracts obtained after hydrolysis (extract B) showed that the main flavone component in the samples of *Thymus* is luteolin (Fig. 1). As for the other components having UV spectra of flavonoids, the peaks due to apigenin had a significantly smaller area compared to that obtained for luteolin. The previously developed and validated procedure for determination of luteolin (21) was adopted for quantitative analysis of luteolin in *Thymus* extracts, as well. The calibration curve of luteolin was made in the concentration range of 0.05-1 mg·ml^{-1}, or expressed in terms of mass of luteolin injected into the column, from 1-20 μg luteolin. The linear dependence of the mass of luteolin injected in the column was established in the whole range. The linear regression equations obtained at 348 nm with the corresponding *RSD* values and the

3·*SD*/*slope*) was found to be 0.09 μg, whereas the limit ofquantification calculated as ten times the same ratio (QL = 10·SD/*slope*) (22) was found to be 0.26 μg of luteolin.

The results from the determination of luteolin in samples of wild *Thymus* spp. from different regions from Macedonia are presented in Table 3. The content of luteolin as well as the content of total flavonoids in air dried material is found to be 0.23-0.48 % (m/m) and 0.26-0.52 % (m/m), respectively.

Comparing the HPLC results to those obtained by spectrophotometry, significant differences in the obtained data can be noticed. These results imply that the spectrophotometric determination of total flavonoids achieves only 16-27 % of the total amount of flavonoids obtained by the HPLC method. This makes the spectrophotometric method with $AlCl_3$ unfavorable for use in the determination of total flavonoids in Thymus species. The present work offers a HPLC method for the determination of luteolin content in the herbs of wild *Thymus*, which can be used in routine analysis of the drug. If other flavonoids are present, they can be quantified as individual, or as total flavonoids. The proposed method is the more important because of the lack of methods for quantification purposes in the available literature.

Table 3. The content of luteolin and total flavonoids in samples of wild growing *Thymus* determined by HPLC (in %)

	Samples	ω (luteolin)	ω (total flavonoids)
1.	*Thymus tosevii* ssp. *tosevii* var. *tosevii* Vel.	0.39	0.47
2.	*Thymus tosevii* ssp. *tosevii* var. *longifrons* Ronn.	0.43	0.47
3.	*Thymus tosevii* ssp. *tosevii* var. *degenii* Ronn.	0.37	0.40
4.	*Thymus macedonicus* (Deg. et Ur.) Ronn.	0.48	0.52
5.	*Thymus moesiacus* Vel.	0.44	0.50
6.	*Thymus alsarensis* Ronn.	0.48	0.49
7.	*Thymus longidens* var. *lanicaulis* Vel.	0.23	0.26

(n=3)

Conclusion

Two methods for the determination of flavonoids in wild *Thymus* species from Macedonian flora were applied: spectrophotometric with $AlCl_3$ and HPLC. The content of total flavonoids in air dried plant material determined by spectrophotometric method ranged from 0.05-0.13 %, calculated as luteolin. The content of total flavones, expressed as luteolin as the main flavone present, determined by HPLC ranged from 0.26-0.52 %. According to the obtained results, UV spectrometric determination achieved only 16-27 % of the total amount of flavonoids obtained by HPLC. That makes the HPLC method highly recommended for use in the determination of flavonoids in Macedonian *Thymus* species.

References

1. V.O. Van Den Broucke, *Fitoterapia*, **54**, 171-174 (1983)
2. V.O. Van Den Broucke and J.A. Lemli, *Pharmaceutisch Weekbiad Scientific Edition*, **5**, 9-14 (1983)
3. J. Cabo, M. E. Crespo, J. Jimenez and A. Zarzuelo, *Plan. Med. et Phytother.*, **20**, 213-218 (1986)
4. Abdel-Sattar, V. Bankova, A. Kujumgiev, A. Gaklabov, A. Ignatova, C. Todorova and S. Popov. *Pharmazie*, **50**, 62-65 (1995)
5. G. Aras and G. E. Grella, *J. Horticul. Sci.*, **67**, 197-202 (1992)
6. N. Nakatani, *ACS Symposium series*, **507**, 72-86 (1992)
7. N. Deighton, S.M. Glidewell, B.A. Goodman and S.G. Deans. *Proceedings of the Royal Society of Edinburg Section B - Biological Science*, **102**, 247-252 (1994)
8. Banias, V. Oreopoulou and C. D. Thomopoulos, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **69**, 520-524 (1992)
9. K. Miura and N. Nakatani, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3043-3045 (1989)
10. T. Adzet, R. Vila and S. Canigueral, *J. Ethnopharmacol.*, **24**, 147-154 (1988)
11. L. Hernandez, F. A. T. Barberan and F. T. Lorente, *Bio. Syst. Ecol.*, **15**, 61-67 (1987)
12. F. A. T. Barberan, L. Hernandez, F. Ferreres, T. Tomas, *Plant. Med.*, **57**, 452-454 (1985)
13. F. Ferreres, F. Tomas, F. A. T. Barberan and L. Hernandez, *Plant. Med. et Phytother.* **19**, 89-97 (1985)
14. T. Adzet and F. Martinez, *Bio.Syst. Ecol.* **9**, 293-295 (1981)
15. F. A. T. Barberan, S. Z. Husain and M. I. Gil, *Bio. Syst. Ecol.*, **16**, 43-46 (1988)
16. S. Kulevanova, M. Stefova and T. Stafilov, *Pharmazie* **55**, 391-2 (2000)
17. S. Kulevanova, M. Stefova and T. Stafilov, *Acta Pharm.*, **50**, 29-37 (2000)
18. S. Kulevanova, T. Stafilov, F. Anastasova, M. Ristic and D. Brkic, *Pharmazie* **52**, 886-888 (1997)
19. T. J. Mabry, K. R. Markham and M. B. Thomas, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer-Verlag, New York-Heidelberg-Berlin, 1970.
20. *Pharmacopoeia Helvetica editio septima*, Eidgenossiche drucksachen - und Materializentrale, 3000 Bern, 1987.
21. S. Kulevanova, M. Stefova, Gj. Stefkov and T. Stafilov, *J. Liquid Chro. & Rel. Techolog.*, **24** (4), 589-600 (2001)
22. *Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods*, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), FDA, 1994.

Резиме

Определување флавони во *Thymus* видови (Lamiaceae) од флората на Р. Македонија

Светлана Кулеванова[1], Марина Стефова[2], Татјана Кадифкова Пановска[1], Јасмина Тоник[1], Трајче Стафилов[2]

[1]*Фармацевтски факултет, Водњанска 17, Скопје, Р. Македонија*
[2]*Институт за хемија, Природно-математички факултет, Скопје, Р.Македонија*

Клучни зборови: *Thymus,* флавони, идентификација, определување, HPLC анализа

Извршена е анализа на флавоните во екстракти добиени од седум *Thymus* видови (Lamiaceae) од Македонија, која опфаќа нивна идентификација и квантитативно определување. Екстракти добиени со постапка на хидролиза на суви надземни делови на растенијата се анализирани со хроматографија на тенок слој (TLC) и течна хроматографија под висок притисок (HPLC). Лутеолинот и апигенинот се сепарирани и се идентификувани во споредба со соодветни автентични стандардни супстанции. Содржината на вкупни флавоноиди во дрогите, определена со UV-Vis спектрометрија, користејќи $AlCl_3$, се движи во граници од 0,05-0,13 %. Содржината на флавоноидите во етерните екстракти се движи од 52,5 до 244,4 mg/ml, додека во етилацетатните екстракти е во граници од 48,7-117,5 mg/ml. За квантификација на лутеолинот употребен е претходно развиен и валидиран HPLC метод, користејќи реверзно фазна колона C18, мобилна фаза составена од 5 % оцетна киселина и метанол со градиентно елуирање и температура на колоната од 40 °C. Содржината на вкупниот лутеолин во дрогите е во граници од 0,23-0,48 % (m/m), додека содржината на вкупни флавоноиди е 0,26-0,52 %.

Macedonian pharmaceutical bulletin, **47 (**1,2) 15-20 (2001)
ISSN 1409 - 8695
UDC:615.457.

Original scientific paper

Effect of the buffer system on stability of tetracaine hydrochloride 0.5% eyedrops

Emilija Fredro-Kumbaradzi[1]*, Tanja Milenkoska[2], Marija Glavas-Dodov[1], Katerina Goracinova[1], Kristina Mladenovska[1]

[1]*Institute of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, .Ss.Cyril and Methodius University, Skopje*
[2]*Center for Military Health Services, Military Pharmacy, Skopje*

Received October 2001; accepted April 2002

Abstract

The effect of the buffer system on the stability of tetracaine hydrochloride in eyedrop formulation was evaluated. Eyedrop formulations containing tetracaine hydrochloride 0.5%(w/v) were prepared using different buffer systems (acetate, phosphate and borate buffer) under a constant pH of 5.4, and a buffer concentration of 0.06M. Long-term tests at 26 °C and accelerated stability tests at elevated temperature (45, 50, 60 °C) over a period of 168 days were carried out by following the macroscopic view, pH, sterility, content of tetracaine hydrochloride and detection of the degradation products. Also, values of the constant of degradation rate at different temperatures and $t_{90\%}$ were calculated. The phosphate and acetate buffers provided satisfactory stability of tetracaine hydrochloride eyedrops, while borate buffer was not sufficient to maintain the pH value of the solution.

Key words: stability, tetracaine hydrochloride, eyedrops, buffer

Introduction

The estimation of stability is an important segment of the process of development of pharmaceutical dosage forms. The choice of optimal formulation is supported by good stability performance. Also stability tests are required for defining the expiry period and storage conditions (1,2).

Tetracaine hydrochloride, as a local anaesthetic agent, is indicated in ophthalmology for diagnostic purposes as well as for surgery and post surgery treatment (3). Eyedrop formulations contain 0.25-1%(w/v) of tetracaine hydrochloride in aqueous media. It should be prepared with respect of adjusting pH.

The pH value is a critical formulation parameter not only because of the physiological tolerance of the eye (4), but also becouse of the pH-dependent stability of tetracaine hydrochloride (5,6). Due to its ester structure, tetracaine hydrochloride is stable at a lower pH (7). As an ester-type compound, tetracaine hydrochloride undergoes hydrolysis, which results in the formation of n-buthyldimethylaminobenzoic acid and dimethylaminoethanol (5,8,9).

Different buffer systems could be used for adjusting the pH value of aqueous solutions of tetracaine hydrochloride intended to be used as eyedrops in a range from 3.7 to 6.5 (5). Generally, the selection of buffer agent should be made with respect not only to adjusting and maintaining the pH of the solution, but also to the type and concentration of buffer agent. Since the hydrolytic degradation of the drug is acid and base catalysed, it is obvious that the buffer concentration should be kept as low as possible to diminish this catalytic effects (1,10). Therefore, in the development stage of the liquid pharmaceutical dosage form, it is necessary to evaluate the stability of the drug substance in dosage form in terms of the catalytic effect of the buffer system. For this purpose, the drug degradation rate should be followed as a function of the type of buffer system in the formulation, while the pH and ionic strength are kept constant.

The aim of this study was to determine whether the type of buffer system (phosphate, acetate, and borate) affects the stability of tetracaine hydrochloride in 0.5%(w/v) eyedrop formulation with pH 5.4 and a buffer concentration of 0.06M.

*emfr@baba.ff.ukim.edu.mk
tel.(389 2) 126032, fax (389 2) 123054

Experimental

Eyedrop formulation

Eyedrops containing 0,5% (w/v) tetracaine hydrochloride were prepared using different buffer systems: phosphate, acetate or borate (pH 5,4; 0,06M). Sodium chloride was used for isotonisation. No microbial preservative was added. Solutions were sterilised by use of bacteriological filtration. Formulations are given in table 1.

Stability testing

Long-term testing at 26 ^{0}C (II climate zone) (2) and short-term, accelerated tests at three elevated temperatures 45, 50 and 60 ^{0}C were used. Macroscopic evaluation (Ph.Eur.3), pH (Ph.Eur.3), sterility (Ph.Eur.3) and drug content (USP XX) were followed at certain time intervals over a period of 168 days. The obtained data were statistically processed. One way analysis of variance and the Scheffe method were used for processing of pH data. Rate constants of hydrolytic degradation of tetracaine hydrochloride at each temperature, the influence of temperature on the rate constant, as well as the $t_{90\%}$ at 26 ^{0}C were estimated (1,2):

$$\ln c = -kt + \ln c_o$$

$$\ln k = \ln A - Ea/RT$$

$$t_{90\%} = 0.105/k$$

where

c_o – *initial drug concentration (t=0)*
c – *drug concentration at time t*
k – *rate constant of the reaction of degradation (time $^{-1}$)*
t – *time*
A – *constant*
Ea – *activation energy*
R – *gas constant*
T – *absolute temperature*
$t_{90\%}$ – *time required for degradation of 10% of drug.*

In order to detect the degradation products, a HPLC method in accordance to the tetracaine hydrochloride eyedrops monograph (USPXXIII) was applied.

Results and discussion

Stability studies on prepared eyedrop formulations of tetracaine hydrochloride 0.5% (w/v) indicated certain changes in the parameters followed.

The long-term study at 26 ^{0}C, did not show any macroscopic change in all three eyedrops formulations over a period of 168 days. Exposure to an elevated temperature (accelerated stability tests) caused very slight red-brownish colouring of the solutions (table 2). The coloration of formulation 1, containing phosphate buffer, was registered after 84 days of storage at 50 ^{0}C and 56 days at 60 ^{0}C, while in the presence of acetate buffer it was noticed after 56 days (45 ^{0}C), 28 days (50 ^{0}C) or 14 days (60 ^{0}C). Formulation 3, prepared using a borate buffer, showed slight coloration only at the highest temperature of 60 ^{0}C after 56 days. The red-brown colour is probably a result of decomposition of n-buthy-laminobenzoic acid, induced by extreme temperature (5,11).

The follow up of the pH value is an important parameter since the decomposition of tetracaine hydrochloride results in pH decrease. Table 3 shows the statistical parameters obtained from pH data by use of one way analysis of variance and the Scheffe method. A statistically significant change of pH value within a storage period of 168 days at 26 ^{0}C was registered only in the eyedrop solution containing borate buffer. Exposure to an elevated temperature facilitated the pH changes in all samples. During the accelerated stability tests, acetate buffer provided the most stable pH value. Taking into consideration the corresponding buffer capacities of the three buffer systems used (table 4), the 0.06M borate buffer has a very low buffer capacity (10^{-6} M HCl), while the same molarity of acetate or phosphate buffer provides higher buffer capacities (10^{-2} and 10^{-4} M HCl respectively). Therefore, an acetate buffer enables the most efficient maintaining of the pH value, while the buffer capacity of borate buffer was insufficient.

Table 1. Tetracaine hydrochloride eyedrop formulations

	formulation		
components	1	2	3
tetracaine hydrochloride	0.5 g	0.5 g	0.5 g
sodium chloride	0.471 g	0.479 g	0.617 g
phosphate buffer 0.06 M, pH 5.4	ad 100ml		
acetate buffer 0.06 M, pH 5.4		ad 100ml	
borate buffer 0.06 M pH 5.4			ad 100ml

Changes in the content of tetracaine HCl during the stability testing is presented in figure 1. Table 5 shows the rate constants of hydrolytic degradation of tetracaine hydrochloride at each temperature, as well as the $t_{90\%}$ at 26 ^{0}C.

As can be seen, the slowest rate of hydrolytic degradation at each temperature occurred in the sample containing borate buffer (table 5). The time required for degradation of 10% of drug substance ($t_{90\%}$) at 26^{0}C was 318 days. This could be explained by: (a) an insufficient buffer capacity of borate buffer (table 4) that allowed a decrease of pH value and (b), an increased stability of tetracaine hydrochloride at a lower pH on the other hand. The stability of tetracaine hydrochloride in formulations containing phosphate and acetate buffer is similar

Table 2. Macroscopic changes of samples 1-3 exposed to different temperatures

temperature	26°C	45 °C				50 °C				60 °C			
time (days)	0 - 168	0	28	56	84	0	28	56	84	0	14	28	56
sample 1	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+
sample 2	—	—	—	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+
sample 3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+

\+ macroscopic changes - no changes

Table 3. Statistical analysis of pH value data - one way analysis of variance and Scheffe method

26 °C						
sample	F_t	F	F-ratio for			F'
			x_0 and x_{28}	x_0 and x_{56}	x_0 and x_{84}	x_0 and x_{168}	
1		3.46	-	-	-	-	
2	3.48	3.37	-	-	-	-	13.92
3		113.82	9.64	17.14	213.34	289.74	
45 °C						
sample	F_t	F	F-ratio for			F'
			x_0 and x_{28}	x_0 and x_{56}	x_0 and x_{84}	
1		116.48	31.50	87.60	330.30	
2	4.07	5.19	5.13	10.05	13.13	12.21
3		173.05	217.56	342.25	425.39	
50 °C						
sample	F_t	F	F-ratio for			F'
			x_0 and x_{28}	x_0 and x_{56}	x_0 and x_{84}	
1		73.79	46.88	142.24	181.51	
2	4.07	18.47	8.96	26.74	50.07	12.21
3		209.93	244.45	412.58	522.16	
60 °C						
sample	F_t	F	F-ratio for			F'
			x_0 and x_{14}	x_0 and x_{28}	x_0 and x_{56}	
1		110.82	129.94	211.76	280.06	
2	4.07	22.58	11.88	32.06	62.06	12.21
3		287.90	330.67	599.76	689.05	

($t_{90\%}$ on 26°C was 181 and 157 days respectively). The degradation rate constant k versus temperature plots for all three formulations are shown comparatively in figure 2. A significant increase in the degradation rate by increasing the temperature is obvious. For phosphate and acetate buffer, by increasing the temperature, k values (day^{-1}) have been changed from 10^{-4} order (26 °C) to 10^{-2} (60 °C).

In order to register the products of degradation of tetracaine hydrochloride, HPLC studies were carried out. A decrease of the

Table 4. Calculated values of buffer capacities

buffer	$\beta_{for\ acid}$ (M HCl)
phosphate buffer (0.06M pH 5.4)	8.41×10^{-4}
acetate buffer (0.06M pH 5.4)	3.05×10^{-2}
borate buffer (0.06M pH 5.4)	7.74×10^{-6}

Table 5. Degradation rate constant (k) and $t_{90\%}$ of tetracaine hydrochloride in eyedrop formulations 1-3 at different temperatures

Sample	k(day^{-1})				$t_{90\%}$(days)			
	26 °C	45 °C	50 °C	60 °C	26 °C	45 °C	50 °C	60 °C
1	$5.80 \cdot 10^{-4}$	$3.31 \cdot 10^{-3}$	$4.63 \cdot 10^{-3}$	$1.51 \cdot 10^{-2}$	181	31.7	22.7	6.9
2	$6.70 \cdot 10^{-4}$	$4.60 \cdot 10^{-3}$	$6.84 \cdot 10^{-3}$	$2.04 \cdot 10^{-2}$	157	22.8	15.3	5.1
3	$3.30 \cdot 10^{-4}$	$1.18 \cdot 10^{-3}$	$1.98 \cdot 10^{-3}$	$4.07 \cdot 10^{-3}$	318	89.0	53.0	25.8

tetracaine hydrochloride quantity in aged samples was accompanied by the appearance of two new peaks in all three formulations. Figure 3 represents comparatively the HPLC chromatograms of sample 1 freshly prepared (a), stored for 56 days at 60 ^{0}C (b) and standard of PABA (c). Comparison of the chromatograms clearly indicates a decrease in the concentration of tetracaine hydrochloride (retention time Rt_1 4.33±0.03) during ageing and the appearance of two new peaks in aged samples (Rt_2 2.42±0.02; Rt_3 3.12±0.01), which could be related to the degradation products (5,9). Since the retention time of standard of PABA (2.41±0.01), proposed as a standard for the detection of related substances (BP99, Tetracaine hydrochloride eyedrops

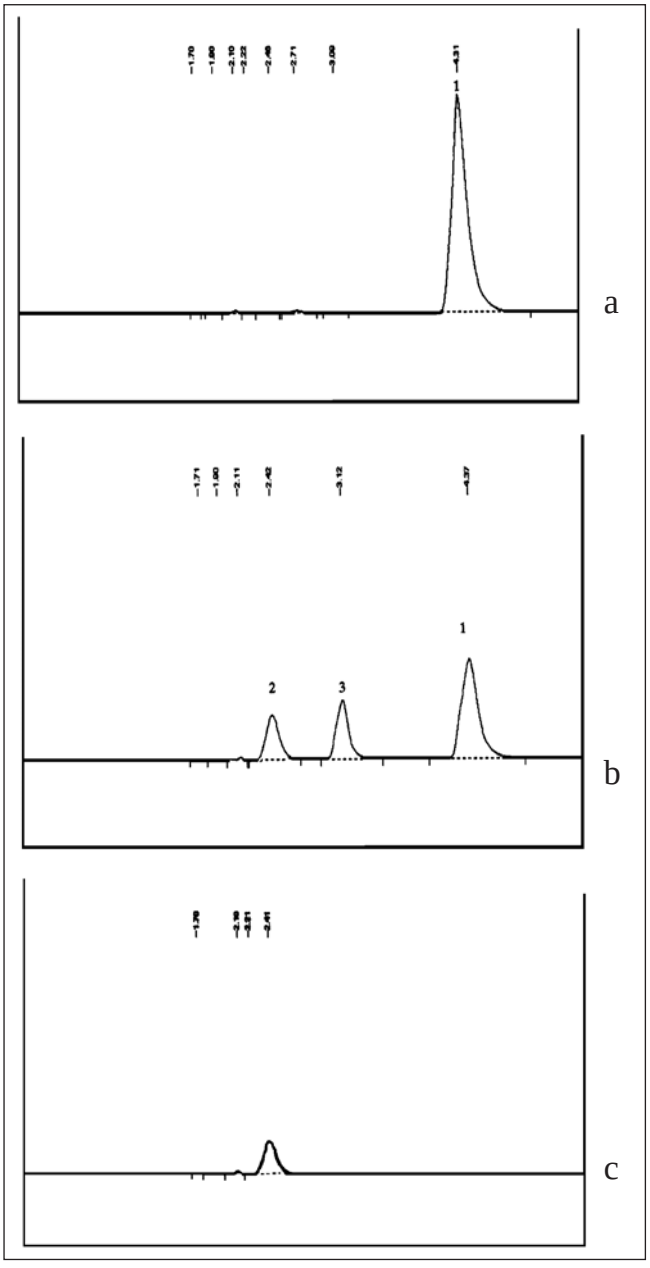


Fig 3. HPLC chromatograms of sample 1: freshly prepared (a), stored for 56 days at 60 ^{0}C (b)a nd standard of PABA (c).

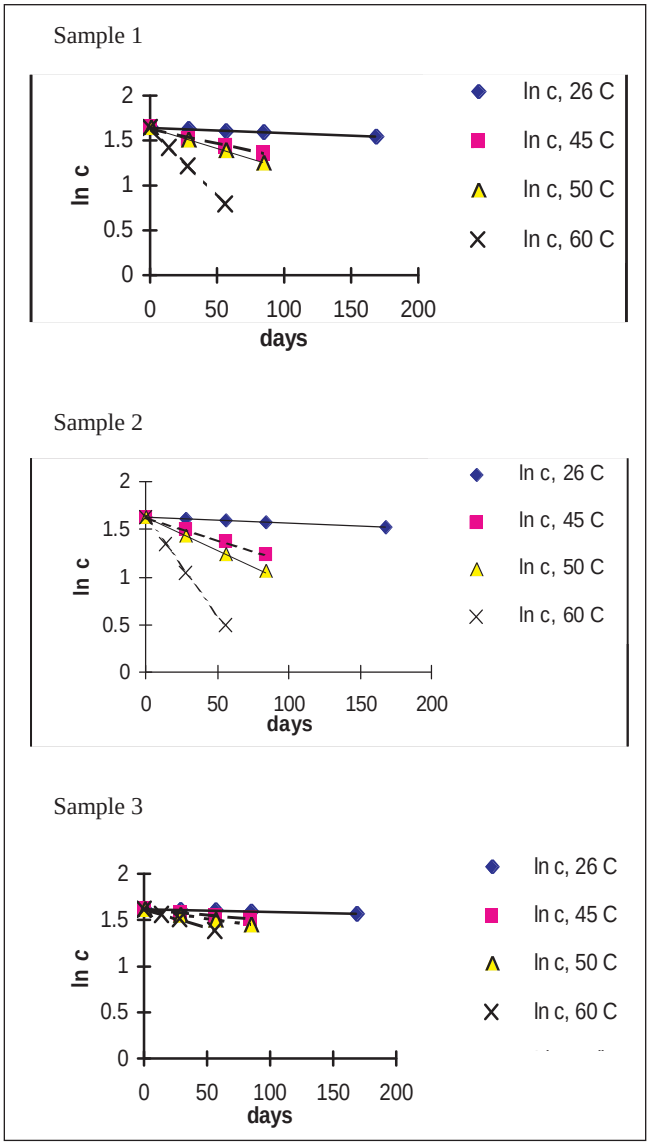


Fig 1. ln c (n =3) versus time plots of samples 1-3 at different temperatures

monograph), corresponds to Rt_2, this peak is related to the n-buthyldimethylaminobenzoic acid.

Regarding the sterility of eyedrop solutions, all three samples remain sterile within a stability testing period of 168 days.

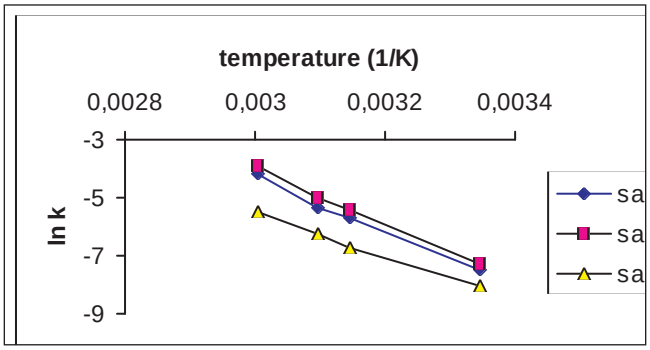


Fig 2. Arrhenius plot for three formulations of tetracaine hydrochloride 0,5% eyedrops

Conclusion

The stability of the tetracaine 0,5%(w/v) eyedrop solution with pH 5,4 and a constant buffer concentration of 0.06M is a function of the buffer system used in formulation. Incorporation of a phosphate or acetate buffer 0.06M with pH 5.4 in formulation of 0,5%(w/v) tetracaine hydrochloride eyedrops provided satisfactory stability ($t_{90\%}$ 181 and 157 days respectively). Although the degradation rate of tetracaine hydrochloride in the formulation containing 0,06M of borate buffer was twice as slow ($t_{90\%}$ 318 days), this formulation is not acceptable because its poor buffer capacity was insufficient to maintain the pH value.

References

1. J. Carstensen, *Drug Stability,* Marcel Dekker, New York,1990
2. W. Grimm, G.Schepky, *Stabilitatpufung in der Pharmazie, Theorie und Praxis,* Ed. Cantor Aulendorf, 1980.
3. *USP Drug Information for the Health Care Professionals,* vol.1, 16th ed., US Pharmacopeial Convention Inc 1997.
4. K.E. Avis, H.A.Lieberman and L.Lachman, Ed., *PharmaceuticaL Dosage Forms,* Parenteral Medications, Marcel Dekker, New York, 1992.
5. R. Dolder and F.Skinner, *Ophtalmica,* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1990
6. D.B. Kersten and B.Gober,U.Tim,*Pharmazie* **36**,341(1981)
7. B. Gober, U.Timm and S.Pfeifer, *Pharmazie* **34** (3),161-164 (1979)
8. J. Breinlich, *Pharm..Ztg.***110**, 579 (1965)
9. G.N. Menon and B.J.Norris, J.*Pharm.Sci.,* **70**(5),569-570 (1981)
10. L. Lachman, H.A. Lieberman and J. Kanig, Ed.,*The Theory and Practice of Industrial Pharmacy,* Lea &Febiger, Philadelphia, 1970.
11. W. Lund, Ed., *The Pharmaceutical Codex,* 12th ed.,The Pharmaceutical Press, London, 1994.

Резиме

Ефект на пуферскиот систем врз стабилноста на капки за очи со 0,5% тетракаин хидрохлорид

Емилија Фредро-Кумбараџи[1], Тања Миленкоска[2], Марија Главаш-Додов[1], Катерина Горачинова[1], Кристина Младеновска[1]

[1]*Институт за фармацевтска технологија, Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје*
[2]*Воена аптека, Центар за военоздравствени услуги, Скопје*

Клучни зборови: стабилност, тетракаин хидрохлорид, очни капки, пуфер

Испитуван е ефектот на пуферскиот систем врз стабилноста на тетракаин хидрохлоридот во очни капки. Приготвени се три формулации на очни капки со 0,5% тетракаин хидрохлорид во кои е употребен различен пуфер (фосфатен, ацетатен или боратен) во концентрација 0,06M и pH вредност 5,4. Стабилноста е испитувана со примена на долготрајни тестови (26 °C) и забрзани тестови за следење на стабилноста (45, 50, 60 °C) во тек на период од 168 дена. Следени се параметрите: макроскопски изглед, pH содржина на тетракаин хидрохлорид и деградациони продукти и стерилност. Определени се константите на брзина на разградба на тетракаин хидрохлоридот на различни температури, како и времето на разградба на 10% од активната компонента $t_{90\%}$. Фосфатниот и ацетатниот пуфер обезбедија задоволителна стабилност на очните капки со тетракаин хидрохлорид, додека боратниот пуфер поради нискиот пуферски капацитет не беше во можност да ја одржи pH вредноста на капките за очи.

Macedonian pharmaceutical bulletin, **47** (1,2) 21-26 (2001)
ISSN 1409 - 8695
UDC: 635.83:547.96(497.7)

Original scientific paper

An evaluation of the protein quality of some macedonian edible Boletaceae mushrooms

Biljana Bauer Petrovska

Faculty of Pharmacy, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, R. Macedonia

Received May 2001; accepted March 2002

Abstract

The nutritional quality of mushroom protein varies and is strongly affected by the relative proportion of each amino acid. Thus, the purpose of this study was to estimate the concentration of the amino acids present in mushroom proteins in order to evaluate the protein nutritional value. In this investigation fifteen field-collected mushroom samples of the Boletaceae family from various parts of Macedonia were included. After acid hydrolysis and pre-column derivatisation with phenyl isothiocyanate (PITC) determination of seventeen amino acids was carried out by the HPLC method. Tryptophan was determined spectophotometrically in the alkaline hydrolysates. The dietary protein quality of the investigated mushrooms was evaluated by comparison of the essential amino acid content with the reference FAO/WHO pattern. Essential amino acids made up 47-75 % of all determined amino acids depending on the origin and the species of the fruit body. Lysine was the most often found limiting amino acid in the investigated mushrooms samples. The nutritional value of proteins calculated by biological value, protein ratio, chemical score and essential amino acid index was very high in the majority of mushrooms studied. The biological value of the mushroom protein varied from 51.3 to 78.9 %. Protein amino acids accounted for about 66.7 % of the total nitrogen, suggesting that a practical nitrogen to protein conversion factor for this Macedonian edible Boletaceae mushroom may be considered to be about 4.17 on average.

Key words: Boletaceae, mushrooms, protein quality, amino acid content, HPLC

Introduction

Proteins are essential components of the diet needed for the survival of animals and humans. Proteins' basic function in nutrition is to supply adequate amounts of necessry amino acids. The protein quality, an important part of the nutritional or nutritive value of a food, depends on its amino acid content. Most literature data consider edible mushrooms as a source of good quality proteins (1,2). In Macedonia many kinds of wild Boletaceae mushrooms have acquired popularity as common food in addition to their usual use as condiments. No information is available so far on the protein content and quality of a great number of the wide-spread wild edible species in question. In order to establish the protein quality of Macedonian edible Boletaceae mushrooms, it is desirable to determine their protein content as well as to estimate the concentration of the amino acids present in their proteins. In this way this report will provide information on these mushrooms from Macedonia, distinguished for their protein content and great nutritional value.

Experimental

Samples

The present study comprised fifteen species of Macedonian edible mushrooms from the Boletaceae family (of the *Boletus*, *Suillus* and *Leccinium* genera). All the samples were field collected in different areas of Macedonian in the course of 1997/99. Identification (3) of the samples was confirmed by Dr. M. Karadelev and voucher specimens were deposited at the Macedonian collection of mushrooms which belongs to the Institute of Biology at the Faculty of Natural Sciences in Skopje. After collecting, dry matter content was determined immediately by drying at 105 ^{0}C and the remaining part was stabilized, dried and milled to pass through a 0.2 mm screen. All

*biba@baba.ff.ukim.edu.mk
tel: 389 2 126032; fax: 389 2 614167

the samples represent the whole mushrooms and were analyzed in triplicate for the determinations.

Protein determination

The level of total nitrogen was determined by the micro -Kjeldahl method (960.52, AOAC, 16th edition, 1995)(4), and percent protein was calculated as % N x 6.25. By substraction of the water released during the amino acid condensation from the protein from the total sum, the net (pure) protein content was calculated (5).

Amino acid analysis

Seventeen amino acids were determined by HPLC after acid hydrolysis with constant boiling hydrochloric acid and pre-column derivatisation with phenyl isothiocyanate (PITC) (6,7). A Perkin Elmer (USA) HPLC equipped with Binary LC Pump (model 250), UV diode array detector (model 235) set at 254 nm and Waters (USA) Pico-Tag column was used. A Mistral thermostated oven (type 880, Spark Holland, The Netherlands) was used for maintaining the constant column temperature at 38±1^{0}C. The amino acid content was calculated upon the standard curve of amino acid standard H (Pierce I, USA). Amino acid standard H was prepared and derivatised simultaneously with the samples.

The mobile phase consisted of aqueous buffer (0.14 mol L^{-1} sodium acetate, 0.5 mL L-1 triethylamine and titrated to pH 6.4 with glacial acetic acid) (Solvent A) and 60 % acetonitrile in water (B) and the flow rate was 1.0 mL min^{-1}. The gradient used for the separation consisted of 10 % B traversing to 51 % B in a ten-minute use of a convex curve (No. 5). A washing step was then programmed to 100 % B in order to clean any residual sample components from the column.

Tryptophan was determined spectrometrically (Perkin -Elmer UV/VIS Lambda 16 spectrometer), after hydrolysis with 5 mol L^{-1} NaOH according to Spies' and Chambers' method (8) modified by Shamanthaka (9).

Protein quality

The dietary protein quality of the investigated mushrooms was evaluated by comparison of the essential amino acid content with the reference FAO/WHO pattern of amino acid requirements for pre-school children (two to five years) (10). The lowest essential amino acid being deficient is marked as the limiting amino acid.

Statistical analysis

Statistical data processing was carried out on STAT-GRAPHICS V. 4.0 and Microsoft Excel 97 softwares.

Results and discussion

The Kjeldahl nitrogen content, protein data and dry matter contents of the fifteen Macedonian edible Boletaceae mushrooms expressed as a percentage on a dry mass basis are listed in Table 1. The dry matter content in the investigated Macedonian edible Boletaceae mushrooms, ranging from 6.5 (*Suillus granulatus*, Shtip) to 17.6 % (*Boletus edulis*, Kavadarci), is relatively low when compared to other foods (11). The average dry matter value of 10.6 is comparable with the theoretical value of 10 % dry matter in mushrooms, which is always used in the literature data when this investigation is not done. Kjeldahl nitrogen varied from 3.6 (*Suillus granulatus*, Probishtip) to 6.6 % (*Boletus edulis*, Kavadarci) which multiplied with the conversion factor 6.25 for proteins amounts to a 22.3-41.3 % protein. The fruiting bodies of the mushrooms contain a number of unusual nitrogenous compounds which may interfere with the commonly used Kjeldahl nitrogen analysis and imply higher protein content values for mushrooms than given in the literature. The net (true) protein values were lower (14.4-26.3 %), even though the obtained protein content was still higher than that of most natural products. *Boletus edulis* samples collected from Krushevo (26.3 %) and Vratnica (25.5 %) contained the highest net proteins levels, whereas *Suillus granulatus* from Probishtip and *Leccinium aurantiacum* from Delchevo were the poorest in net proteins (14.4-16.6 %). Net protein nitrogen value compared with total nitrogen content was apparently different between species and ranged between 62.9 and 72.7 %. Since the Kjeldahl method does not distinguish between protein and non-protein nitrogen, the average value of 66.7 % and a practical nitrogen -protein conversion factor 4.17 might be used for evaluation of the net protein content in the Macedonian edible Boletaceae mushrooms. This coincides with Ogawa's (12) results of 65 % protein nitrogen in mushrooms from Japan and Stankeviciene's (13) value of 69.8 % protein nitrogen for Lithuanian mushrooms.

The dry matter content in the investigated mushrooms samples is not significantly correlated with the total nitrogen ($p>0.05$; $t=1.66$) and net proteins content ($p>0.05$; $t=1.57$).

The amino acid composition of the fifteen investigated Macedonian edible mushroom samples from the Boletaceae family is presented in Tables 2 and 3. All of the eighteen investigated amino acids, including the essential ones, were present in all mushroom proteins. Among amino acids, threonine, alanine, arginine, cysteine and aspartic acid predominated. These data coincide with Fujita's (14) assumption that aspartic acid and alanine are the most abundant amino acids constitutive of mushroom proteins. Among amino acids, tryptophan was present in the lowest amount, but still meeting the tryptophan requirements. Some authors (15) state that mushrooms are

good sources of this amino acid and report the value of 11-20 g kg^{-1} protein, which is in agreement with our average tryptophan value of 10.56 g kg^{-1} protein. The lowest concentration of total amino acids of 16.7 % was found in *Suillus granulatus* from Probishtip and the highest amino acids concentration of 30.6 % was found in *Boletus edulis* from Krushevo. The amino acid pattern was different in all studied samples, but the quantitative ratios were identical in mushrooms of the same genus. The content of aromatic amino acids in all investigated samples was consistent at about 4.2 % (*Leccinium aurantiacum*, Delchevo) to 14.6 % (*Boletus edulis*, Vratnica) of the total amino acids. The average value of 8.7 % aromatic acid found in this report was lower than that reported by Vetter (16) in mushrooms of various Russula and Agaricus species (10.8 % on average). The average sulphur amino acids content of 11.60 % of the total amino acids in the mushrooms analyzed was higher if compared with the average value of 4.6 % found by Vetter (16). Acid amino acids accounted for 5.3 % of total amino acids in Boletus edulis from Vratnica to 20.6 % in Suillus granulatus from Probishtip. The content of heterocyclic amino acids varied in concentration limits from 3.3 % (*Boletus edulis*, Vratnica) to 10.4% (*Leccinium aurantiacum*, Delchevo). Aliphatic monoamino monocarbonic amino acids proved to be more abundant than other investigated amino acids and were present in 48.8% on average. Overall differences in regard to the content of each amino acid per net protein (Table 3) could be noticed in different investigated samples. This confirmed the fact that amino acid content depends on botanical origin. Comparison with other food proteins (17) of vegetable (wheat, potato, tomato, banana) and animal (beef, milk) origin indicated that mushroom proteins have a higher proportion of glycine, arginine, threonine, alanine, tyrosine, methionine, cysteine and isoleucine and a lower proportion of serine, phenylalanine and lysine. An increase in the proportion of eight amino acids in comparison the a decreased proportion of three amino acids still reflects the high nutritive value of mushroom proteins. The average net protein value of 20.8 % in Macedonian edible Boletaceae mushrooms (Table 1) was higher than that in vegetable food (3.9 % banana, 12.4 % tomato) and lower than that in food of animal origin (24.9 % milk, 70.0 % beef meat).

By comparing the obtained amino acid values from fifteen species of Macedonian edible mushrooms from the Boletaceae family with the proposed reference FAO/WHO protein pattern (10), the following parameters were calculated and are presented in Table 4: E:N (ratio of essential to non -essential amino acid), E:T (ratio of essential to total amino acids), BV (biological value), PER (protein efficiency ratio), A/T (chemical score), EAAI (essential amino acid index), LAA (limiting amino acid) and X (percent limiting amino acid storage). The results show that E:N, E:T and E:P ratios were highest in *Boletus luridus* from Probishtip and lowest in *Boletus edulis* from Kavadarci. The biological value of the investigated mushrooms fluctuated from 51.3 % (*Boletus edulis*, Delchevo) to 78.9 % (*Suillus granulatus*, Probishtip). Compared to the recent FAO reference pattern (10), lysine was the most limiting essential amino acid in the Macedonian edible Boletaceae mushrooms. According to the PER value, two *Boletus edulis* samples from Krushevo and Ograzden and one *Suillus granulatus* sample from Probishtip could serve as a source of high-quality proteins. Six samples of *Boletus edulis* (from Radovish, Veles, Gostivar, Vratnica, Kavadarci and Probishtip) and samples of *Suillus granulatus* (Shtip) and *Leccinium aurantiacum* (Delchevo) have medium-quality proteins. Low-quality proteins were estimated in two samples of Boletus edulis (from Kichevo and Delchevo) and in both the Boletus luridus samples (from Ljuboten and Probishtip). Nutritional value parameters (10) for some other proteins such as that for 70-80 % wheat flour, soybean and beef meat, were used comparatively (Table 4). According to the BV parameter, the data indicated that eight of the fifteen investigated mushroom proteins were of higher quality than the soybean protein, which is in all literature reports marked as having a nutritional value similar to that of animal proteins (2). However, this did not apply to the EAAI value. *Suillus granulatus* from Probishtip showed the highest biological value, but the EAAI value is not highest because the EAAI calculations include all the essential amino acids ratios compared to BV' while only the lowest amino acid ratio is included. The EAAI values showed that in the investigated wild Macedonian edible Boletaceae mushrooms, all the essential amino acids, except the limiting one, were present in quantities meeting dietary requirements.

Conclusion

Due to their botanical origin, the amino acid content and protein nutritional parameters of the investigated wild Macedonian edible Boletaceae mushrooms showed considerable differences.

Macedonian edible mushrooms, when compared to other food sources, contain greater protein quantity and represent a good protein food source.

A nitrogen to protein converting factor of 4.17 was obtained for the investigated Macedonian edible Boletaceae mushrooms.

Table 1. Dry matter, Kjeldahl nitrogen, crude and net protein content in the investigated mushrooms samples (% dry mass)

Sample (location)	Dry matter	Nitrogen	Crude protein (N x 6.25)	Net protein
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Radovish)	10.99	4.52	28.25	17.78
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Veles)	13.04	5.11	31.94	21.52
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Kitchevo)	13.93	5.38	33.62	23.76
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Krushevo)	12.31	6.61	41.31	26.35
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Gostivar)	12.47	5.44	34.00	22.40
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Delchevo)	17.59	5.60	35.00	22.42
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Vratnica)	15.63	5.62	35.12	25.50
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Ograzden)	14.32	5.19	32.44	22.72
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Kavadarci)	17.18	4.11	25.69	17.82
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Probishtip)	15.29	5.34	33.37	21.64
Boletus luridus Schiff.: Fr. (Ljuboten)	9.82	4.52	28.25	19.75
Boletus luridus Schiff.: Fr. (Probishtip)	13.29	4.87	30.44	20.24
Suillus granulatus (L.:Fr.) O.Kuntze (Shtip)	6.46	4.33	27.06	19.67
Suillus granulatus (L.:Fr.) O.Kuntze (Probishtip)	10.79	3.57	22.31	14.36
Leccinium aurantiacum (Bull.) S.F.Gray (Delchevo)	9.46	4.15	25.94	16.58

Table 4. Protein nutritional parameters

Sample (location)	E:N	E:T	E:P	BV	PER	A/T	EAAI	LAA	X
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Radovish)	1.64	0.62	0.72	58.05	1.54	30.68	0.78	Leu	69.32
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Veles)	0.98	0.49	0.58	61.44	1.71	36.03	0.68	Lys	63.96
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Kitchevo)	1.03	0.51	0.59	55.65	1.42	26.90	0.52	Lys	73.10
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Krushevo)	1.65	0.62	0.72	69.32	2.11	48.45	1.35	Lys	51.55
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Gostivar)	1.03	0.51	0.59	61.55	1.72	36.21	0.73	Lys	63.79
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Delchevo)	1.32	0.57	0.66	51.28	1.20	20.00	0.89	Lys	80.00
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Vratnica)	1.55	0.61	0.70	59.15	1.60	32.41	1.30	Lys	67.59
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Ograzden)	1.31	0.57	0.66	76.64	2.49	60.00	1.22	Leu	40.00
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Kavadarci)	0.88	0.47	0.54	59.06	1.59	32.27	0.51	Leu	67.73
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Probishtip)	0.89	0.47	0.54	62.87	1.79	38.27	0.81	Lys	61.72
Boletus luridus Schiff.: Fr. (Ljuboten)	1.50	0.60	0.70	55.12	1.40	26.06	0.85	Leu	73.94
Boletus luridus Schiff.: Fr. (Probishtip)	3.05	0.75	0.87	55.22	1.40	26.21	0.92	Leu	73.79
Suillus granulatus (L.:Fr.) O.Kuntze Shtip)	2.27	0.69	0.81	64.44	1.87	40.79	1.31	Leu	59.24
Suillus granulatus (L.:Fr.) O.Kuntze (Probishtip)	1.28	0.56	0.65	78.94	2.60	63.63	0.91	Lys	36.36
Leccinium aurantiacum (Bull.) S.F.Gray (Delchevo)	1.40	0.58	0.68	61.01	1.69	35.36	0.72	Lys	64.64
beaf meat 70-80 % wheat flour soybean				85.00	2.90	73.20			26.80
				57.50	1.50	29.80			70.20
				59.90	1.60	33.50			66.50

*E:N (ratio of essential to non-essential amino acid), E:T (ratio of essential to total amino acids), BV (biological value), PER (protein efficiency ratio), A/T (chemical score), EAAI (essential amino acid index), LAA (limiting amino acid) and X (percent limiting amino acid storage)

Table 3. Amino acid content in wet proteins (g per 16 g of N and per 100 g wet protein)

Sample (location)	Asp	Glu	Ser	Gly	His	Arg	Thr	Ala	Pro	Tyr	Val	Met	Cys2	Ile	Leu	Phe	Lys	Trp
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Radovish)	5.12	6.47	5.12	6.97	7.87	4.61	28.68	4.72	10.97	4.33	3.20	4.89	9.17	2.98	2.02	5.29	2.92	0.90
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Veles)	6.74	4.79	2.09	7.34	5.44	7.53	17.33	23.8	6.74	4.92	3.76	5.02	9.43	4.37	2.46	1.58	2.09	0.74
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Kitchevo)	4.97	4.84	2.02	11.83	7.24	11.07	10.27	17.0	5.55	5.22	7.95	5.93	8.12	7.11	2.10	2.61	1.56	0.80
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Krushevo)	6.03	3.38	0.99	5.77	3.60	7.97	20.42	13.9	5.84	8.96	5.01	2.01	11.12	6.11	5.39	6.07	2.81	0.83
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Gostivar)	3.57	4.02	1.96	7.32	4.73	12.32	14.20	24.1	3.88	6.38	3.97	5.80	10.62	5.85	3.48	0.85	2.10	1.03
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Delchevo)	16.23	4.64	0.58	4.06	3.39	12.80	10.75	8.70	3.08	10.48	5.75	8.07	16.15	2.63	1.96	4.99	1.16	0.85
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Vratnica)	3.29	2.86	0.90	5.92	4.47	11.45	7.72	19.1	2.08	13.53	5.02	7.84	15.76	5.65	3.49	3.49	1.88	1.72
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Ograzden)	5.72	4.27	2.46	6.73	2.29	12.98	24.21	13.2	4.93	6.03	5.94	6.51	5.63	3.65	3.96	3.08	3.65	0.92
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Kavadarci)	12.18	6.56	3.76	9.09	6.00	2.75	18.80	21.9	5.39	7.63	2.19	3.53	4.77	4.54	2.13	1.96	2.24	0.73
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Probishtip)	9.47	6.98	5.27	10.07	5.27	8.41	3.79	12.0	8.92	5.82	8.96	6.65	3.97	4.67	8.50	3.42	2.22	1.80
Boletus luridus Schiff.: Fr. (Ljuboten)	6.78	9.11	1.26	9.82	6.33	10.94	35.90	3.75	4.91	3.59	8.10	3.29	4.51	1.67	1.72	1.32	1.82	1.72
Boletus luridus Schiff.: Fr. (Probishtip)	5.14	2.72	1.58	8.55	4.59	4.89	52.32	2.86	2.96	9.49	4.79	3.95	2.72	1.78	1.73	1.63	3.90	0.59
Suillus granulatus (L.:Fr.) O.Kuntze (Shtip)	4.83	4.22	2.39	5.54	2.49	9.66	32.59	4.02	4.88	5.49	4.27	8.18	10.47	7.83	2.69	2.85	2.90	0.91
Suillus granulatus (L.: Fr.) O.Kuntze (Probishtip)	19.92	4.04	2.65	3.48	10.93	12.39	7.45	3.97	4.60	5.71	5.43	4.18	13.72	2.99	5.99	4.11	3.69	0.97
Leccinium aurantiacum (Bull.) S.F.Gray (Delchevo)	15.74	4.22	3.01	6.63	5.55	3.68	36.13	4.22	10.80	3.38	6.51	2.65	2.53	3.26	3.01	1.51	2.05	1.33

Sample (location)	Asp	Glu	Ser	Gly	His	Arg	Thr	Ala	Pro	Tyr	Val	Met	Cys2	Ile	Leu	Phe	Lys	Trp
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Radovish)	0.91	1.15	0.91	1.24	1.40	0.82	5.10	0.84	1.95	0.77	0.57	0.87	1.63	0.53	0.36	0.94	0.52	0.16
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Veles)	1.45	1.03	0.45	1.58	1.17	1.62	3.73	5.13	1.45	2.25	0.48	0.99	1.41	0.94	0.53	0.34	0.45	0.16
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Kitchevo)	1.18	1.15	0.48	2.81	1.72	2.63	2.44	4.04	1.32	1.24	1.89	1.41	1.93	1.69	0.50	0.62	0.37	0.19
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Krushevo)	1.59	0.89	0.26	1.52	0.95	2.10	5.38	3.67	1.54	2.36	1.32	0.53	2.93	1.61	1.42	1.60	0.74	0.22
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Gostivar)	0.80	0.90	0.44	1.64	1.06	2.76	3.18	5.41	0.87	1.43	0.89	1.30	2.38	1.31	0.78	0.19	0.47	0.23
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Delchevo)	3.64	1.04	0.13	0.91	0.76	2.87	2.41	1.95	0.69	2.35	1.29	1.80	3.62	0.59	0.44	1.12	0.26	0.19
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Vratnica)	0.84	0.73	0.23	1.51	1.14	2.92	1.97	4.88	0.53	3.45	1.28	2.00	4.02	1.44	0.89	0.89	0.48	0.44
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Ograzden)	1.30	0.97	0.56	1.53	0.52	2.95	5.50	3.01	1.12	1.37	1.35	1.48	1.28	0.83	0.90	0.70	0.83	0.21
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Kavadarci)	2.17	1.17	0.67	1.62	1.07	0.49	3.35	3.91	0.96	1.36	0.39	0.63	0.85	0.81	0.38	0.35	0.40	0.13
Boletus edulis s.l. Bull.: Fr. (Probishtip)	2.05	1.51	1.14	2.18	1.14	1.82	0.82	2.60	1.93	1.26	1.94	1.44	0.86	1.01	1.84	0.74	0.48	0.39
Boletus luridus Schiff.: Fr. (Ljuboten)	1.34	1.80	0.25	1.94	1.25	2.16	7.09	0.74	0.97	0.71	1.60	0.65	0.89	0.33	0.34	0.26	0.36	0.34
Boletus luridus Schiff.: Fr. (Probishtip)	1.04	0.55	0.32	1.73	0.93	0.99	10.59	0.58	0.60	1.92	0.97	0.80	0.55	0.36	0.35	0.33	0.79	0.12
Suillus granulatus (L.:Fr.) O.Kuntze (Shtip)	0.95	0.83	0.47	1.09	0.49	1.90	6.41	0.79	0.96	1.08	0.84	1.61	2.06	1.54	0.53	0.56	0.57	0.18
Suillus granulatus (L.: Fr.) O.Kuntze (Probishtip)	2.86	0.58	0.38	0.50	1.57	1.78	1.07	0.57	0.66	0.82	0.78	0.60	1.97	0.43	0.86	0.59	0.53	0.14
Leccinium aurantiacum (Bull.) S.F.Gray (Delchevo)	2.61	0.70	0.50	1.10	0.92	0.61	5.99	0.70	1.79	0.56	1.08	0.44	0.42	0.54	0.50	0.25	0.34	0.22

References

1. J. Vetter, *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **3** 224-227 (1993).
2. M. Friedman, *J. Agric. Food Chem.* **44** 6-29 (1996).
3. M. Moser, *Die Röhrlinge und Blätterpilze, Kleine Kryptogamenflora,* Band II b/2, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 1983.
4. AOAC *Official Methods of Analysis,* 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA 1990.
5. *FAO Nutritional Studies. Amino acid content of foods and biological data of proteins,* Rome 1970.
6. B. Bidlingmeyer, S. Cohen and T. Tarvin, *J. Chromatogr*. **336** 93-104 (1984).
7. D.R. Koop, E.T. Morgan, G.E. Tarr and M.J.Coon, *J. Biol. Chem.* **257** 8472-8480 (1982).
8. J.R. Spies and D. C. Chambers, *Anal. Chem.* **21** 1240-1266 (1949).
9. M.C. Shamanthaka and D.R. Sastry, *J. Sci. Food Agric*. **37** 535-538 (1986).
10. FAO/WHO Protein Quality Evaluation, *Food and Agricultural Organization of the United Nations*, Rome 1991.
11. S.W. Souci, W. Fachmann, H. Kraut, *Food Composition and Nutrition Tables*. Meddpharm-Scientific Publishers, Stuttgart, 1994.
12. T. Ogawa, Y. Oka and K. Sasaoka, *J. Food Sci*. **52** 154-157 (1987).
13. D. Stankeviciene and V. Urbomas, *Liet. TSR Mokslu Akad., Ser.* C **4** 109-114 (1988).
14. T. Fujia, H. Kumori, S. Komemushi and K. Yamagata, Lett. *Appl. Mikrobiol*. **10** 137-139 (1990).
15. P. Surinrut, K. Julhamn and L. Njaa, *Qual. Plant.-Plant Foods Hum. Nutr.* **37** 117-125 (1987).
16. J. Vetter, *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **197** 381-384 (1993).
17. F. Sosulski and G. Imafidon, *J. Agric. Food Chem.* **38** 1351-1356 (1990).

Резиме

Оценка на квалитетот на протеините на некои македонски јадливи габи од фамилијата Boletaceae

Билјана Бауер Петровска

Фармацевтски факултет, Водњанска 17, 1000 Скопје, Р. Македонија

Клучни зборови: Boletaceae, габи, протеини, аминокиселини, HPLC

Хранливата вредност на протеините на сите јадливи габи не е еднаква и е зависна од релативниот удел на секоја аминокиселина. Според тоа, целта на оваа студија беше да се одреди количеството на поодделните аминокиселини во вкупните протеини, со што ќе се овозможи утврдување вредности на параметри за оценување на хранливата вредност на протеините на јадливите габи и нивно вреднување како протеински намирници. Во ова испитување беа вклучени 15 примероци на самоникнати видови јадливи габи од фамилијата Boletaceae, собрани од различни подрачја на Македонија. По претколонска дериватизација на аминокиселините во кисели хидролизати со фенилизотиоцијанат (PITC) со HPLC метод е определувана содржината на 17 аминокиселини. Триптофанот е определуван со спектрофотометриски метод во базни хидролизати. Хранливата вредност на протеините во испитуваните габи оценета е врз основа на содржината на есенцијалните аминокиселини во однос на истите аминокиселини во предложениот модел од ФАО/СЗО. Во зависност од потеклото и од видот на плодоносните тела на испитуваните примероци јадливи габи, есенцијалните аминокиселини се застапени од 47-75 %. Најчесто најдена лимитирачка аминокиселина е лизинот. Повеќето од испитаните видови јадливи габи од фамилијата Boletaceae имаат висока биолошка вредност, висок индекс на ефикасност и високо место во хемиската скала на протеини. Биолошката вредност на протеините на испитуваните примероци јадливи габи се движи во граница од 51,3 до 78,9 %. Вкупните присутни аминокиселини застапени околу 66,7 % во вкупниот азот на испитуваните примероци, ја наметнуваат потребата од намалена вредност (4,17) на протеински конверзационен фактор за овие видови македонски јадливи габи.

Macedonian pharmaceutical bulletin, **47** (1,2) 27-36 (2001)
ISSN 1409 - 8695
UDC: 615.014.8 : 678.743

Proffesional paper

Parametars for the evaluation of the quality of PVC containers for pharmaceutical preparations

Aneta Dimitrovska[1]*, Liljana Ugrinova[1], Suzana Trajkovic-Jolevska[1], Slavica Tanceva[2]

[1]*Institute of Drug Quality Control, Faculty of Pharmacy, Sts. Cyril and Methodius University, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia,* [2]*OHIS A.D., 1000 Skopje, Macedonia*

Received April 2001; accepted March 2002

Abstract

An overview of the parameters for the evaluation of the quality of poly(vinyl chloride) (PVC) containers for pharmaceutical preparations is made. The requirements for the quality of PVC containers regulated by Ph. Eur., DIN and ISO standards differ in the prescribed parameters for physical, chemical and biological examination. Different ranges of tolerance for certain parameters also exist. The comparison of the parameters prescribed for these types of containers in Ph. Eur., DIN and ISO standards is made for a more detailed evaluation of PVC container quality.

Key words: poly(vinyl chloride) containers, pharmaceutical preparations, evaluation of the quality

Introduction

The primary containers used for packing of pharmaceutical preparations should provide a physically, chemically and microbiologically stable, therapeutically effective and non-toxic product within the date of expiry.

The material used for the production of containers for pharmaceutical preparations should comprise one or more polymers, including some additives (lubricants, stabilizators, plastificators, anti-oxidants, colors and pigments, anti-static agents, etc.)

The most widely used polymers include: polyethylene (low and high density), polypropylene, poly(vinyl chloride), poly(ethylene tereftalate) and ethyl-vinyl acetate copolymer (1). The polymer of choice used for the packaging of water solutions for intravenous infusion and packaging for blood and blood elements of human origin, is plastificated poly(vinyl chloride).

Physico-chemical methods and separative techniques are widely used for the evaluation of the quality of pharmaceutical containers (2). Among the spectroscopic methods, infrared spectroscopy is the method of choice for the identification of the components that comprise the contents of the containers in question; ultraviolet spectroscopy for the identification and the quantitative determination of extractive additives that contain conjugated double bonds and aromatic rings; and atomic absorption spectroscopy for the determination of trace metals. Among the separative techniques, thin-layer chromatography is most often used for identification; high-pressure liquid chromatography for the separation of the main polymer of the additives, their identification and determination, and gas chromatography for the determination of some monomers as impurities, for example vinyl chloride (2).

The aim of this study is to determine the quality of PVC containers for pharmaceutical preparations using selected parameters, grouped as physical, chemical and biological tests. An overview and comparison of the parameters prescribed for this type of containers in Ph. Eur., DIN and DIN ISO standards will be carried out for a more detailed assessment of the quality of PVC containers.

* e-mail:aneta.dimitrovska@baba.ff.ukim.edu
tel: 126 024 Fax: 123 054

Experimental

Materials

Poly(vinyl chloride) bags for aqueous solutions for intravenous infusion (500 ml), (sample 1) and sterile containers of plasticised poly(vinyl chloride) for human blood containing an anticoagulative solution (450 ml) (sample 2).

Methods

For the evaluation of the quality of the material in question, physical, chemical and biological studies were conducted according to the steps outlined in:

- Ph. Eur.
- DIN 53 363-15 - Infusion bags and bottles made of plastic (sample 1)
- DIN ISO 3826 - Plastics collapsible containers for humanblood and blood components (sample 2)
- Internal procedures for the determination of the content of a PVC polymer; plastificator and liquid stabilizators, fillers and solid stabilizators and vinyl chloride content.

Preparation of the test solution and blank for the chemical and biological tests was done according to the steps outlined in Ph. Eur. (by autoclavation at 110 ^{0}C for 30 minutes with distilled water and sterile apirogen 0.9 % solution of NaCl for chemical and biological test, respectively).

Results and discussion

Physical tests

The physical tests of the PVC containers include examination of appearance, dimensions, thickness of the walls, resistance to temperature, pressure and sealing, resistance to centrifugation and leakage, stretching, with the goal of evaluating the physical characteristics of the packaging.

The thickness of the wall of the plastic containers should provide the packaging to be non-permeable to gases, moisture and microorganisms, thus ensuring the quality of the pharmaceutical preparation until the expiry date. Permeability for gases, moisture and microorganisms decreases with increased thickness of the wall of the containers. The thinnest plastic packaging should be 0.1 mm. Double this thickness (0.2 mm) decreases the permeability for gasses by 70 %. The manufacturers of different plastic containers for pharmaceutical preparations suggest that the thinnest wall should be 0.3 mm, which would ensure the quality of the plastic containers regarding permeability. However, the walls of the plastic containers should not be abnormally thick because the plastic packaging should posses a certain flexibility that allows easy and complete filling and emptying, ensuring a correct way of administering the medication.

Table 1. Physical tests on PVC containers for aqueous solutions for intravenous infusion

Parameters	Results	Standards and Limits	
	Sample 1	Ph. Eur.	DIN 58 363 - 15
Resistance to temperature, pressure and sealing	complies^{DIN}	/*	- 25 ^{0}C to 50 ^{0}C for 24 hours internal pressure: 20 kPa for 10 min.
Resistance to fall	complies^{DIN}	/*	Fall from 2 m on hard base
Vapor permeability	complies^{DIN}	/*	T = 20 ± 5 ^{0}CRH ≤ 60 % for 21 days Loss in mass is not greater than 5 % for the shelf life of a plastic container
Transparency	complies$^{Ph\ Eur}$	Primary opalescent suspension diluted 1 in 400	Primary opalescent suspension (1 : 100)
Attaching to plastic bag	complies^{DIN}	/*	Part intended for attachment required to stand force from 25 N for 60 min.
Permanence of labeling	complies^{DIN}	/*	The printing on the label remains legible and the label shall not separate from the container after removal from water if plastic container is submerged in water at a temperature 20 ± 1 ^{0}C for 24 hours
Appearance	complies	Internal specification	
Dimensions	complies	Internal specification	
Thickness of wall (mm)	0.35	Internal specification	

n = 6; /* parameter is not prescribed for examination

Table 2. Physical tests on sterile containers of plasticised PVC for human blood containing an anticoagulant solution

Parameters	Results	Standards and Limits	
	Sample 2	Ph. Eur.	DIN ISO 3826
Resistance to centrifugation	complies[Ph Eur]	5000 *g* for 10 min. no leakage perceptible and no permanent distortion occur	5000 *g* for 30 min. T = 4 ^{0}C and T = 37 ^{0}C no leakage perceptible and no permanent distortion occur
Resistance to stretch (%)	3.82[Ph Eur]	20 N	20 N
Leakage	complies[Ph Eur]	Internal pressure: 100 kPa for 10 min.	Internal pressure: 67 kPa for 10 min.
Vapor permeability	complies[Ph Eur]	T = 5 ± 1 ^{0}C RH = 50 ± 5 % for 6 weeks Loss in mass: max 2 %	T = 5 ± 1 ^{0}C RH = 50 ± 5 % for 21 days Loss in mass: max 1 %
Emptying under pressure	complies[Ph Eur]	Internal pressure: 40 kPa The container empties in less than 2 min.	Internal pressure: 40 kPa The container empties in less than 2 min.
Speed of filling	complies[Ph Eur]	Internal pressure: 9.3 kPa The volume of liquid which flows into the container in 8 min. is not less than the nominal capacity of the container	Internal pressure: 9.3 kPa The volume of liquid which flows into the container in 8 min. is not less than the nominal capacity of the container
Resistance to temperature variations	complies[Ph Eur]	T = - 80 ^{0}C for 24 hours T = 50 ^{0}C for 20 min.	T = - 80 ^{0}C for 24 hours T = 50 ^{0}C for 12 hours
Transparency	complies[Ph Eur]	Primary opalescent suspension (1 : 16)	Primary opalescent suspension (1 : 16)
Appearance	complies	Internal specification	
Dimensions	complies	Internal specification	
Thickness of wall (mm)	0.37	Internal specification	

n = 6

The thickness of the wall of the tested PVC bags for water solutions for intravenous infusion and blood and blood products varies within the range of 0.33-0.38 mm, declared by the manufacturer. The tested PVC bags also meet the other physical requirements important for the quality of the containers (Table 1 and 2).

Parameters such as resistance to centrifugation, leakage, empting under pressure, speed of filling are specific for assessment of the quality of the PVC containers for human blood. These PVC bags also meet the requirements for resistance to stretching that is important for the containers' quality. Among the tested containers, there were no examples of tearing or prolonged deformation of the material during the application of a force of 20 N, due to the elastic properties of the plastic containers. A larger percentage of stretching, without tearing or prolonged deformation of the material, implies better elastic properties.

Chemical tests

The identification of the main polymer, poly(vinyl chloride) and the corresponding plastificator for PVC containers, di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), was done using IR spectroscopy, in comparison with the referent IR spectra (3) and the IR spectra of the standard substances.

After the separation of the plastificator DEHP and PVC (extraction with diethyl ether in an apparatus by Soxlet) in the appropriate PVC packaging, they were re-identified by the IR method, which confirms their presence. A thin layer of the sample in tetrahydrofuran was applied to a NaCl plate and the spectra were recorded in the range from 4000 to 600 cm^{-1}. The resulting IR spectra are shown in Fig. 1.

The results of the chemical tests on investigated PVC bags are given in Table 3 and 4.

The requirements for the quality of the PVC packaging are regulated by Ph. Eur., DIN and ISO standards. In order to make a complete evaluation of the investigated PBC bags' quality, all the parameters prescribed in these standards were included.

The requirements for the physical parameters of plastic bags for water solutions for intravenous infusion, except for its transparency, are not specified by Ph. Eur., unlike the DIN standard, which sets out exact regulations; the confirmation of

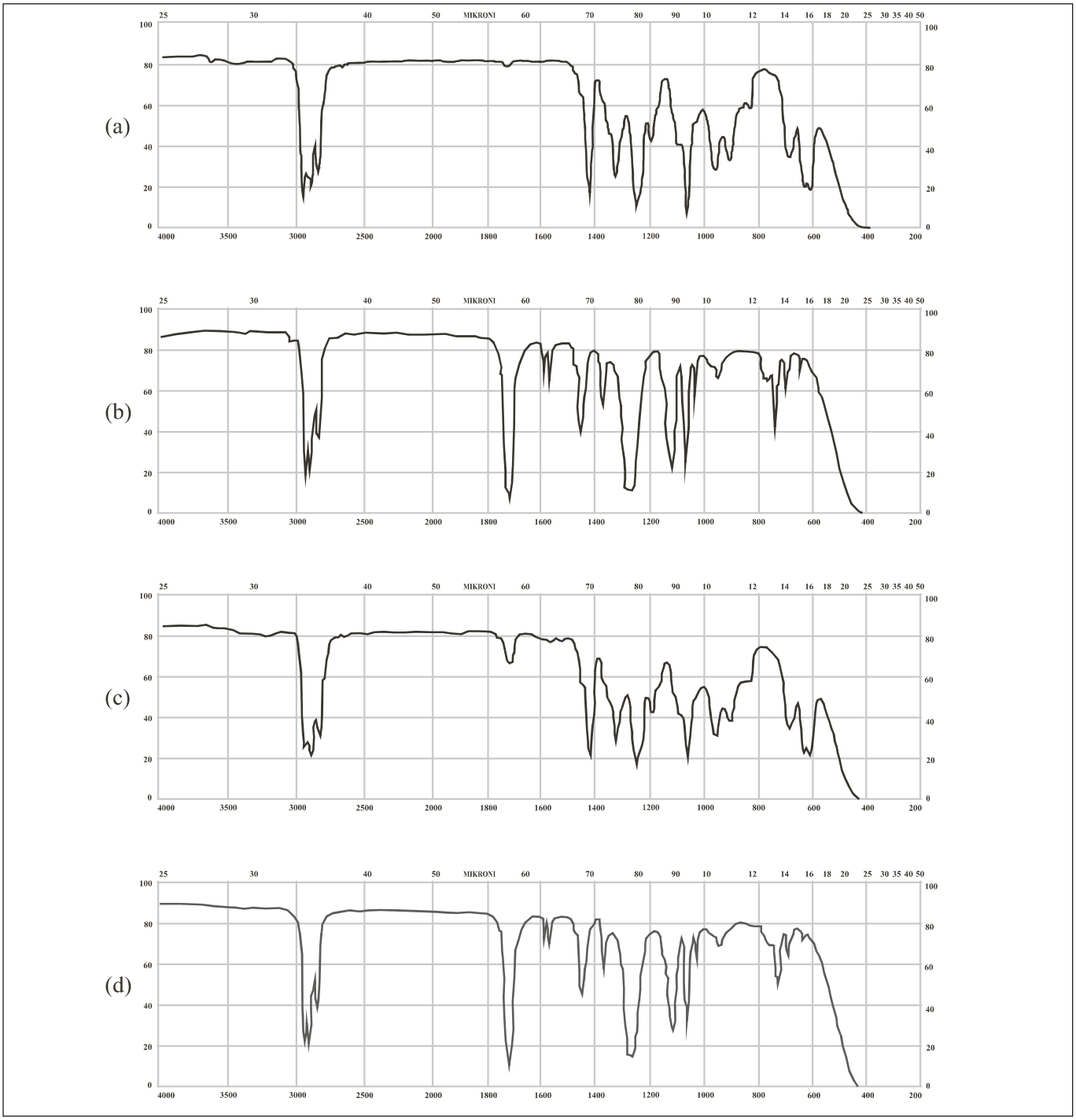


Fig. 1. IR spectra of PVC (a) and DEHP (b), standard substances; PVC (c) and DEHP (d) after their separation from sample 1

the presence of impurities such as SO_4^{2-}, NH_4^+, and Cl^-, as part of the chemical tests prescribed for PVC is not prescribed in Ph. Eur. for PVC bags for water solutions for intravenous infusion, whereas such regulations are upheld by the DIN standard. Furthermore, Ph. Eur. does not require tests for the presence of heavy metals in all types of plastic packaging, whereas DIN and DIN ISO standards do require the test for heavy metals represented as Pb^{2+} or their individual determination, for example: Ba, Cr, Cu, Pb, Sn, Cd, and Al for plastic packaging for water solutions for intravenous infusions, and Ba, Pb, Sn and Cd for plastic packaging for blood and blood products. In contrast to Ph. Eur., the DIN standard also requires testing for mechanical impurities in plastic bags for water solutions for intravenous infusions with the exact number and size of the particles.

In addition, the allowed presence of Cl^- as an impurity in PVC packaging for blood and blood products is 0.4 ppm and 4 ppm according to Ph. Eur. and DIN ISO standards respectively.

Table 3. Results of chemical tests on PVC containers for aqueous solutions for intravenous infusion

Parameters	Results	Standards and Limits	
	Sample 1	Ph. Eur.	DIN 58 363 - 15
Appearance of solution clarity/color	complies$^{Ph\ Eur}$	Clear and colorless solution	Clear solution, not more opalescent than reference suspension
Acidity or alkalinity	complies$^{Ph\ Eur}$	max. 0.4 ml 0.01 mol/L NaOH or max. 0.8 ml 0.01 mol/L HCl / 4 % of the nominal capacity of the container	max. 0.8 ml 0.01 mol/L NaOH or max. 0.8 ml 0.01 mol/L HCl / 20 ml
pH (4.0 - 4.5)	5.56$^{DIN\ 13098}$	/*	/*
Mechanical particles	complies$^{DIN\ 58\ 363\ -15}$	/*	Particles ≥ 2 μm: max. 200/ml Particles ≥ 5 μm: max. 20/ml
Absorbance (230 - 360 nm)	0.020 $^{Ph\ Eur}$ (250 nm)	max. 0.200	max. 0.250
Oxidisable substances (mlA - mlSl) 0.002 mol/L $KMnO_4$	0.65 ml $^{Ph\ Eur}$	max. 1.5 ml	max. 3.0 ml
SO_4^{2-}	complies $^{DIN\ 58\ 363-15}$	/*	10 ppm
NH_4^+	complies$^{DIN\ 58\ 363-15}$	/*	0.8 ppm
Cl^-	complies$^{DIN\ 58\ 363-15}$	/*	4 ppm
Residue on evaporation (mg/100 ml)	2.57$^{DIN\ 58363-15}$	/*	5.0
Heavy metals (ppm)	Pb = 0.00 Cd = 0.00 Sn = 0.00 (DIN 58 363-15)	/*	1. Pb^{2+}: 1.6 ppm 2. AAS Ba, Cr, Cu, Pb: 1 ppm Sn, Cd: 0.1 ppm Al: 0.01 ppm

n = 6; /* parameter is not prescribed for examination

The total content of the plastificator DEHP and the liquid stabilizators is determined by gravimetric means, after a 16-hour extraction period with diethyl ether in an apparatus by Soxlet. The content of the PVC polymer is determined gravimetrically after dissolving the residue, obtained from extraction, in cyclohexanon and its precipitation with methanol. The content of the fillers and solid stabilizators are represented by the undissolved part in cyclohexanon, as dry residue.

According to the specifications of Ph. Eur., the content of the PVC polymer in PVC primary containers intended for water solution for intravenous infusions and blood and blood products should be at least 55%. The determined content of the PVC polymer in the samples is above the required minimum, and the necessary elasticity of the PVC bags is obtained by the addition of a plastificator in content of max. 40 %, as specified in Ph. Eur.

The content of extractive di(2-ethylhexyl)phthalate (DEPH), used as a plastificator, is also tested in order to determine the PVC containers' quality. Determination of the content of DEPH extracted from the solvent is accomplished through a calibration graph constructed by the absorbances of the solutions of

Table 4. Results of chemical tests on sterile containers of plasticised PVC for human blood containing an anticoagulant solution

Parameters	Results	Standards and Limits	
	Sample 2	Ph. Eur.	DIN ISO 3826
Appearance of solution	complies[DIN ISO]	/*	Clear solution, not more opalescent than reference suspension II
Volume of anticoagulant solution	complies[Ph Eur]	± 10 % from the stated volume of anticoagulant solution	/*
Spectrophotometric examination of anticoagulant sol. (250 - 350 nm)	0.030[Ph. Eur] (280 nm)	The absorbance at the maximum at 280 nm is not greater than 0.5	/*
Acidity or alkalinity	complies[Ph Eur]	max. 0.4 ml 0.01 mol/L NaOH or max. 0.8 ml 0.01 mol/L HCl / 4 % of the nominal capacity	max. 0.4 ml 0.01 mol/L NaOH or max.0.8 ml 0.01 mol/L HCl / 10 ml sol.
Absorbance 230 - 360 nm	no absorbance[Ph Eur]	max. 0.300 (230 – 250 nm) max. 0.100 (251 – 360 nm)	max. 0.200
Oxidisable substances (mlA - mlSl) 0.002 mol/L $KMnO_4$	0.45 ml [Ph Eur]	max. 2.0 ml/8 % of the nominal capacity of the container	max. 2.0 ml/20 ml sol.
NH_4^+ (ppm)	complies[Ph Eutr]	2 ppm	2 ppm
Cl^- (ppm)	complies[Ph Eutr]	0.4 ppm	4 ppm
Extractable di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) mg/100ml	complies [Ph. Eur] (Table 4)	10.0 mg/100 ml (volume: 300 – 500 ml) 13.0 mg/100 ml (volume: 150 – 300 ml) 14.0 mg/100 ml (volume to 150 ml)	10.0 mg/100 ml
Vinyl chloride	complies*	1 ppm	1 ppm
PVC	complies (Table 3)*	min. 55 %	/*
Plasticizers and liquid stabilizers	complies (Table 3)*	max. 40%	/*
Residue on evaporation (mg/100 mg)	0.2[Ph Eur]	max. 3.0 mg/100 ml	max. 3.0 mg/100 ml
Heavy metals (ppm)	Pb = 0.00 Cd = 0.00 Sn = 0.00 (DIN ISO 3826)	/*	AAS Ba, Pb: 1 ppm Sn, Cd: 0.6 ppm
Ash (mg/g)	0.1[DIN ISO 3826]	/*	1 mg/g

n = 6 * - internal procedure;
* - parameter is not prescribed for examination

Table 5. Results of determination of PVC polymer and additives in PCV bags

Sample	PVC polymer (%)	Plastificator* and liquid stabilizators (%)	Fillers and solid stabilizators (%)	Total (%)
1	71.05	28.95	traces	100
2	63.66	36.44	traces	100

*plastificator - di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)

DEHP, standard substance in the concentration range of 2 to 20 mg/100 ml, at λ=272 nm. The regression line estimated by linear least-squares regression analysis is represented by the equation: y = 0.0271 + 0.0231x, with a correlation coefficient of 0.9994. The content of vinyl chloride in the PVC packaging is determined by the method of gas chromatography (head space), FID detector and S/S column, ¼, 6 m (15% Diethylhexylsebacate /Chromosorb W DMCS, 80/100 mesh). The chromatogram of vinyl chloride, standard substance, and the chromatograms of vinyl chloride (VC) in PVC bags are given in Fig. 2.

The retention time for vinyl chloride, standard substance is approximately 4 minutes. The absence of a peak which corresponds to the retention time of vinyl chloride, standard substance, is noticeable in the chromatograms obtained from samples 1 and 2, implying total polymerization of the vinyl chloride - monomer in the process of production of the tested PVC containers. The concentration of the prepared standard solution of vinyl chloride of 1 ppm, at the same time represents the maximum allowed presence of VC in the PVC packaging, taking into consideration its toxicity and the possibility of its migration into the solution.

Biological tests

The most widely used tests for the biological study of this type of containers are: the pyrogen test, abnormal toxicity, the test for haemolysis and sterility (Ph. Eur.) and permeability of microorganisms (DIN).

The pyrogen test (4) is used to determine the presence of pyrogen substances of non-microbiological origin, most often originating from the packaging material.

The plastic masses are inert and do not show a toxic effect if the polymerization of the polymer is complete. If the final product is not well purified it could contain a substance or an additive which is not chemically bonded to the polymer. The monomers, plastificators, stabilizators, catalysts, fillers and other additives, which are molecules with a small molecular weight, can easily migrate into the solution and display a toxic effect. Toxicity could also be a result of the migration of the glue and the ink used in the printing of the label into the solution. Beside the monomer and the additives, the presence of tin as a form of impurity could also lead to a hemolysis of the erythrocytes (5). Due to these, for the evaluation of plastic packaging quality, the test for abnormal toxicity and the test for hemolysis are also conducted.

Table 6. Content of extractive DEPH, obtained by calibration graph

Sample	Absorbance, λ=272 nm	Concentration (mg/100 ml) (max. 10 mg/100 ml)
1. (bag with capacity of 500 ml)	0.1599	5.76
2. (primary bag with capacity of 400 ml)	0.1506	5.36

A sterility test is prescribed only for sterile bags of plasticised poly(vinyl chloride) for human blood containing an anticoagulant solution (sample 2), following the membrane filtration procedure outlined in Ph. Eur.

The plastic packaging should not be permeable to microorganisms, as a secondary contamination of the product. The permeation of microorganisms is controlled by the appropriate thickness of the walls of the plastic packaging. A thickness of the plastic wall of 0.04 mm, prevents the permeation of microorganisms into the solution. As the walls at the joining points could be thinner, the thickness of the walls of the plastic packaging should be at least 0.1 mm.

A cultivating medium where the samples (PVC bags) were kept during the examination was innoculated with *Bacillus subtilis* varieties Niger NCTC 10073. The cultivating medium in the tested PVC bags stayed clear after the proposed time of incubation, which indicates the impermeability of the plastic packaging to the tested microorganism.

The tested primary containers intended for pharmaceutical preparations is apyrogen, nontoxic, sterile, and does not cause haemolysis to the erythrocytes and it is impermeable to microorganisms.

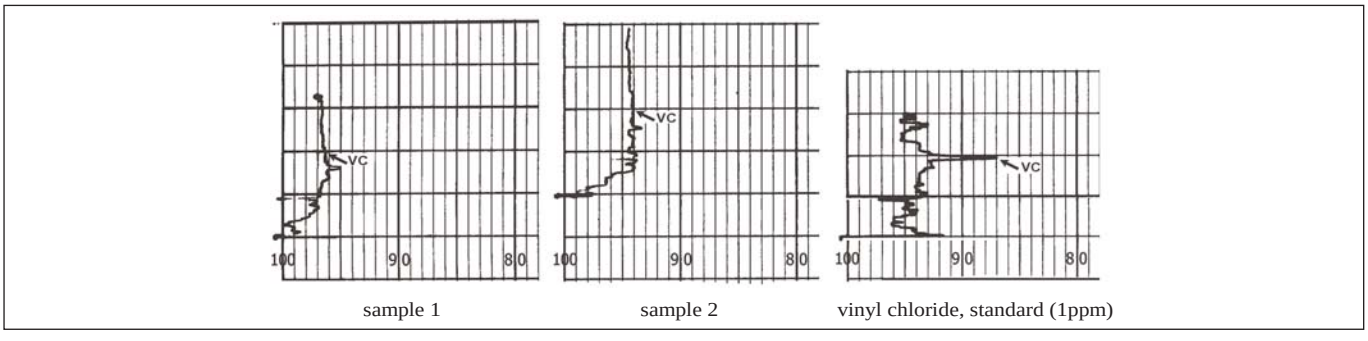


Fig 2. Chromatograms of determination of vinyl chloride in tested PVC containers and vinyl chloride, standard substance (1 ppm) in N,N dimethylacetamid

Table 7. Results of biological tests on PVC bags

Sample	Pyrogen test Ph Eur	Abnormal toxicity Ph. Eur	Sterility Ph Eur	Permeability to microorganisms DIN ISO	Haemolytic value (%) Ph Eur (max 10%)					
					I cell	control cell I	Δ %	II cell	control cell II	%
1	complies	complies	/*	complies	8.12	17.36	**9.24**	51.42	60.81	**9.39**
2	complies	complies	complies	**/***	8.87	17.36	**8.49**	50.97	60.81	**9.84**

Standards and limits			
DIN 58363 – 15 (Sample 1)	DIN ISO 3826 (Sample 2)	Ph. Eur.	
/*	Containers comply with test for sterility (membrane filtration)	Containers comply with test for sterility (membrane filtration)	Sterility
Haemolytic value not greater than 10 %	Haemolytic value not greater than 10 %	Haemolytic value not greater than 10 %	Haemolytic effects in buffered systems
Complies with test for pyrogens	Complies with test for pyrogens	Complies with test for pyrogens	Pyrogens
Complies with test for abnormal toxicity	Complies with test for abnormal toxicity	Complies with test for abnormal toxicity	Abnormal toxicity
Containers are not permeable to microorganisms	/*	/*	Permeability to microorganisms
Containers do not challenge mutation on cell culture	Containers do not challenge mutation on cell culture	/*	Cytotoxicity

Conclusion

The requirements for PVC container quality are regulated by Ph. Eur., DIN and DIN ISO standards. The specifications should encompass the parameters prescribed in Ph. Eur, DIN and DIN ISO standards for a more detailed evaluation of PVC container quality, and synchronize the allowed ranges of tolerance for certain parameters, as well.

References

1. *European Pharmacopoeia*, 3rd Edition, Council of Europe, Strasbourg, 1997

2. A. Kenneth, L. Herbert and L. Leon, *Pharmaceutical Dosage Form: Parenteral Medications*, Part 10: Use of Plastics for parenteral packaging, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York, 1992, pp 393- 433.

3. Hummel/Scholl, *Infrared Analysis of Polymers*, Resins and Additives An Atlas, Wiley-interscience, A Division of John Wiley & Sons, Inc., New York, London, Toronto, 1969.

4. K. Richter, W. D. Grahlow and R. Wigert, *Acta Biol. med. Ger.*, **39**: 2-3, 277-280 (1980).

5. Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Chapter 85: *Plastic Packaging materials*, 19th edition, MackPublishing company, Easton, Pennsylvania, 1995, pp 1487 - 1493.**Вовед**

Резиме

Параметри за процена на квалитетот на PVC амбалажа наменета за фармацевтски препарати

Анета Димитровска[1], Лилјана Угринова[1], Сузана Трајковиќ-Јолевска[1], Славица Танчева[2]

[1]*Институт за испитување и контрола на лекови, Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Водњанска 17, 1000 Скопје, Македонија,* [2]*ОХИС А.Д., 1000 Скопје, Македонија*

Клучни зборови: поли(винил хлорид) амбалажа, фармацевтски препарати, процена на квалитет

Направен е преглед на параметрите за процена на квалитетот на поли(винил хлорид) амбалажа наменета за фармацевтски препарати. Барањата за квалитет на PVC амбалажата пропишани според Ph. Eur., DIN и DIN ISO стандардите се разликуваат во однос на предвидените параметрите за физички, за хемиски и за биолошки испитувања. Исто така, пропишани се и различни граници на дозволено отстапување на одделни параметри. Споредбата на параметрите пропишани според Ph. Eur., DIN и DIN ISO стандардите за овој вид амбалажа е направена со цел да се изврши поцелосна процена на квалитетот на PVC амбалажата.

Македонски фармацевтски билтен, **47** (1,2) 37-42 (2001)
ISSN 1409 - 8695
UDK: 616.153.96(497.7)

Стручен труд

Референтни интервали на Apo A-1, Apo B и соодносот Apo B/Apo A-1 во примерок на македонска популација

Светлана Цековска*, Соња Алабаковска, Катерина Тошеска,
Даница Лабудовиќ, Бојана Тодорова

Институт за медицинска и експериментална биохемија, Скопје
Медицински факултет, 50-та Дивизија бр. 6, Скопје.

Примен октомври 2001, прифатен април 2002

Апстракт

Нарушувањата во серумските концентрации на аполипопротеините А-1 и В (Apo A-1 и Apo B), како и соодносот аполипопротеин Б/аполипопротеин А-1 (Apo B/Apo A-1), се смета дека претставуваат независни ризик фактори за коронарна срцева болест. Се препорачува секоја лабораторија да определи сопствени референтни интервали за серумските концентрации на Apo A-1 и на Apo B, како и за соодносот Apo B/Apo A-1, бидејќи тие зависат од географската локација. За таа цел ги определивме серумските концентрации на Apo A-1 и на Apo B и го пресметавме Apo B/Apo A-1 соодносот кај 122 здрави индивидуи од македонска популација (70 жени и 52 мажи) на возраст од 18-60 години. При определувањето користевме комерцијален, стандардизиран мануелен имунотурбидиметриски тест (Randox).

Измерените концентрации (x ± SD) изнесуваа: Apo A-1 = 1,39 ± 0,28 g/l во женската популација и 1,42 ± 0,27 g/l во машката популација, а Apo B = 0,95 ± 0,24 g/l во женската и 1,00 ± 0,23 g/l во машката популација. Пресметаниот Apo B/Apo A-1 сооднос изнесуваше 0,70 ± 0,17 кај женската популација и 0,72 ± 0,18 кај машката популација. Студентовиот t-тест покажа дека не постои сигнификантна разлика ($p>0,05$) во средните вредности за Apo A-1 и за Apo B, како и за Apo B/Apo A-1 соодносот, меѓу женската и машката подгрупа, односно дека поделбата според полот не е потребна од дијагностичка гледна точка. Концентрациите на Apo A-1 и на Apo B пресметани за мешаната група (H=122) изнесуваа 1,40 ± 0,28 g/L и 0,97 ± 0,23 g/L. Соодносот Apo B/Apo A-1 во целата група изнесуваше 0,71 ± 0,17.

Типот на дистрибуција на вредностите за серумските Apo A-1 и Apo B, како и соодносот Apo B/Apo A-1 беше тестиран преку определување на вредностите на коефициентот на асиметрија (Skewness), на коефициентот на сплоснатост (Kurtosis) и на стандардните девијации на овие два коефициенти. Вредностите на овие коефициенти за сите три параметри покажаа дека дистрибуцијата на вредностите е според Гаусовата (Gauss) крива. Во согласност со нормалната дистрибуција, референтните граници за Apo A-1, за Apo B, како и за Apo B/Apo A-1 соодносот беа определени параметарски (средна аритметичка големина ± 2 стандардни девијации).

Референтните интервали за Apo A-1 изнесуваа 0,84 - 1,96 g/l, 0,51 - 1,43 g/l за Apo B и 0,37 - 1,05 за соодносот Apo B/Apo A-1.

Клучни зборови: Apo A-1, Apo B, соодносот Apo B/Apo A-1, имунотурбидиметриски тест, референтни интервали.

Аполипопротеинот А-1 е носечкиот аполипопротеин во липопротеините со голема густина (high density lipoproteins HDL). Главна улога на аполипопротеинот А-1 е активација на ензимот Lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT) и отстранување на слободниот холестерол од екстрахепаталните ткива. Според тоа, Apo A-1 може да се опише како неатероген, покажувајќи инверзна поврзаност со ризикот од коронарна артериска болест. Намалувањето на концентрацијата на Apo A-1 во серумот, секогаш проследено со намалувањето на концентрацијата на HDL- холестеролот, значително го зголемува ризикот за атеросклероза (1).

*Svetlana Cekovska e-mail: scekovska@yahoo.com
tel: 119-164; fax: 230-431

Аполипопротеинот Б е главна протеинска компонента на липопротеините со ниска густина (low density lipoproteins LDL), познати како атерогени липопротеини. Apo B, заедно со Apo E е неопходен за реакцијата на LDL со B/E рецепторите и е вклучен во транспортот на холестеролот до периферијата (крвните садови, периферни ткива). Резултатите од поголем број студии (2,3,4) укажуваат на директната поврзаност меѓу зголемените серумски концентрации на Apo B и коронарната артериска болест.

Резултатите од голем број епидемиолошки и клинички студии (5,6,7) говорат во прилог на тоа дека нарушувањата на серумските концентрации на аполипопротеините, особено Apo A-1 и Apo B подобро корелираат со коронарната артериска болест, отколку другите липидни и липопротеински параметри. Исто така, резултатите од повеќе проспективни студии (4,8,9) укажуваат на значењето на одредувањето на серумските концентрации на Apo A-1 и Apo B, како супериорни маркери за процена на ризикот за развиток на коронарна артериска болест. Според најновите сознанија (4), Apo B е значаен дискриминирачки фактор за предвидување на ризикот за развиток на атеросклерозата кај нормолипидемични индивидуи. Заради тоа, се препорачува анализите на липидите, секогаш кога е тоа индицирано, да се прошират и со определување на серумската концентрацијата на Apo A-1 и на Apo B. Некои автори (10,11) го посочуваат количникот меѓу серумските концентрации на Apo A-1 и на Apo B (Apo A-1/Apo B или Apo B/Apo A-1) како значаен параметар за процена на ризикот од коронарна артериска болест. Во нашето испитување, ние го определувавме соодносот Apo B/Apo A-1, кој многу добро корелира со атерогениот индекс LDL-холестерол/HDL-холестерол.

Постојат поголем број методи за определување на серумските концентрации на Apo A-1 и на Apo B, од кои почесто се користени имунотурбидиметриските, нефелометриските, радиоимуноесејот (RIA) и методот на радијална имунодифузија (RID). Секој од овие методи се карактеризира со различна осетливост и прецизност (12), па според тоа постојат и разлики во вредностите на Apo A-1 и на Apo B, определени со различни методи. Од тие причини, потребно е методот со кој ќе се определуваат серумските концентрации на Apo A-1 и Apo B во една лабораторија да биде стандардизиран.

Резултатите од една студија, наречена SENECA (13) покажаа дека кај возрасните Европејци постои хетерогеност во поглед на референтните вредности на липидните параметри, вклучувајќи ги Apo A-1, Apo B и Apo B/Apo A-1 соодносот, со пониски средни вредности забележани кај општата популација на Португалија, на Шпанија, на Грција и на Италија, во споредба со земјите од северна и одсредна Европа (Норвешка, Данска, Холандија, Франција и Швајцарија). Разлики во серумските концентрации на Apo A-1, на Apo B и на Apo B/Apo A-1 соодносот се забележани и кај општата популација во Америка меѓу белците од европско и од латиноамериканско потекло (14). Поголем број студии (4,15,16) покажуваат дека постојат и разлики меѓу расите, со повисоки вредности за Apo A-1 и пониски вредности за Apo B забележани кај црната раса, односно пониски референтни вредности за Apo A-1 и Apo B кај жолтата раса.

Што се однесува до разликите во однос на полот, се среќаваат различни податоци во различни популации, кај некои се забележуваат разлики меѓу двата пола во однос на серумските концентрации на Apo A-1 и на Apo B, а кај некои не (15,17,18,19,20). Испитувано е, исто така, и влијанието на возраста врз серумските концентрации на Apo A-1 и на Apo B и на Apo B/Apo A-1 соодносот. Резултатите од истражувањата (17,19) покажуваат дека кај возрасните индивидуи од двата пола се забележани незначителни промени во серумската концентрација на Apo A-1 со зголемување на возраста, додека и кај двата пола е утврдена зависност на концентрацијата на Apo B и на Apo B/Apo A-1 соодносот од возраста.

Со оглед на големиот број фактори (пол, возраст, географски разлики), како и изборот на методот, кои можат да влијаат врз референтните вредности, пожелно е секоја лабораторија да определи сопствени граници на референтни вредности.

Цел на нашата студија беше да се определат серумските концентрации на Apo A-1 и на Apo B, како и на Apo B/Apo A-1 соодносот кај здрава популација, да се утврди типот на дистрибуцијата на вредностите преку испитувањето на хипотезата за согласување со Гаусовата дистрибуција и да се определат референтните интервали на испитуваните параметри.

Експериментален дел

Во испитувањето беа опфатени 122 здрави, нормолипидемични испитаници, од кои 70 жени и 52 мажи на возраст од 18 до 60 години. Критериум за нормолипидемичност беа вредностите за вкупен холестерол пониски од 6,5 mmol/l, триглицериди пониски од 2,3 mmol/l и вредности за HDL-холестерол повисоки од 0,9 mmol/,

Табела 1. Серумски концентрации на Apo A-1 и на Apo B (g/L) и на Apo B/Apo A-1 сооднос во женската и во машката подгрупа и во целата група (средна аритметичка големина ± стандардна девијација)

параметар	N	женска подгрупа	N	машка подгрупа	N	заедно
Apo A-1	70	1,39 ± 0,28	52	1,42 ± 0,27	122	1,40 ± 0,28
		t = 0,6; p > 0,05				
Apo B	70	0,95 ± 0,24	52	1,00 ± 0,23	122	0,97 ± 0,23
		t = 1,16; p > 0,.05				
Apo B/A-1 сооднос	70	0,70 ± 0,17	52	0,72 ± 0,18	122	0,71 ± 0,17
		t = 0,6; p > 0,05				

N – број на испитаници; t - Студентов t-тест ; p – сигнификантност на разлики меѓу женската и машката подгрупа

определени според лични искуства во работа со македонската популација.

Како материјал во испитувањето користевме серум, добиен со венепункција по 12-14 часа гладување. Концентрацијата на Apo A-1 и на Apo B беше определувана веднаш или серумските примероци беа чувани најмногу две недели на +4 °C, односно два месеца на - 20 °C, време за кое не настануваат значителни промени во концентрациите на Apo A-1 и на Apo B.

Серумските концентрации на Apo A-1 и на Apo B беа определувани со употреба на комерцијален, стандардизиран мануелен имунотурбидиметриски тест (Randox). Методот се темели на реакцијата на Apo A-1, односно на Apo B со специфични антисеруми, при што доаѓа до формирање нерастворлив комплекс, кој може да се мери турбидиметриски на 340 nm (21). Отчитувањето на апсорбенциите е направено на фотометар „Искра" MA 9510. Концентрациите на Apo A-1 и на Apo B во испитуваните примероци серум беа отчитани од претходно конструирана стандардна крива со употреба на WHO/IFCC стандардизиран калибратор. Заради контрола на точноста паралелно со секоја серија испитувани серуми беше определувана и концентрацијата на Apo A-1 и на Apo B во контролни серуми со точно позната концентрација на испитуваните параметри. прецизноста изразена преку коефициентот на варијација (KV) изнесуваше помалку од 3% за иста серија и помалку од 6% од ден на ден, и за двата параметра.

Статистичката обработка на податоците беше направена со употреба на програмата Statistica for Windows 5.0. Податоците од различните групи беа споредувани со помош на Студентовиот t-тест. Според препораките на IFCC (Интернационална федерација по клиничка хемија), типот на дистрибуција на вредностите на Apo A-1 и на Apo B беше тестиран преку определување на вредностите на коефициентот на асиметрија (Skewnwss, Ks) и на коефициентот на сплоснатост (Kurtosis, Kk) и нивните стандардни девијации. Врз основа на вредностите на овие коефициенти, хипотезата за согласување на типот на дистрибуцијата со Гаусовата дистрибуција се отфрла ако апсолутната вредност на двата или на еден од коефициентите е поголема од нивната стандардна девијација помножена со 2,6 (22).

Резултати и дискусија

Серумските концентрации на аполипопротеините изнесуваа: Apo A-1 ± 1,39 Б 0,28 g/l кај женската подгрупа и 1,42 ± 0,27 кај машката, а Apo B ± 0,95 ± 0,24 g/l кај женската и 1,00 ± 0,23 g/l кај машката подгрупа. Пресметаниот Apo B/Apo A-1 сооднос изнесуваше 0,70 ± 0,17 кај женската подгрупа и 0,72 ± 0,18 кај машката подгрупа. Резултатите се прикажани во Табела 1.

Студентовиот t-тест покажа дека не постои статистички сигнификантна разлика (p>0,05) во средните вредности за Apo A-1 и на Apo B, како и за Apo B/Apo A-1 сооднос, меѓу женската и машката подгрупа, односно дека поделбата според полот не е потребна од дијагностичка гледна точка. Концентрациите на Apo A-1 и на Apo B пресметани за сите испитаници (N=122) изнесуваа 1,40 ± 0,28 g/l и 0,97 ± 0,23 g/l. Сооднос Apo B/Apo A-1 пресметан за целата група изнесуваше 0,71 ± 0,17.

На сл. 1 и 2 се прикажани дистрибуциите на добиените вредности за серумските концентрации на Apo A-1 и на Apo B.

Добиените вредности за коефициентот на асиметрија и за коефициентот на сплоснатост, како и нивните стандардни девијации за Apo A-1 (Ks= 0,34, Ss = 0,22; Kk = - 0,06, Ks = 0,44) доведоа до заклучокот дека дистрибуцијата на вредностите за Apo A-1 е нормална, Гаусовата дистрибуција (Слика 1).

Вредностите за коефициентот на асиметрија и за ко-

ефициентот на сплоснатост за Apo B (Ks = - 0,11, Ss = 0,22; Kk = - 0,90, Ks = 0,44) покажаа дека и дистрибуцијата на вредностите за Apo B е нормална (Слика 2).

Исто така, од добиените вредности за коефициентите (Ks=-0,24, Ss =0,22; Kk = - 0,89, Ks = 0,44) за Apo B/Apo A-1 соодносот може да се заклучи дека и оваа дистрибуција е во согласност со Гаусовата дистрибуција.

Во согласност со нормалната дистрибуција на вредностите за Apo A-1, за Apo B и Apo B/Apo A-1 соодносот референтните граници за овие три параметра беа определени параметарски (средна аритметичка големина ± 2 стандардни девијации).

Референтните интервали изнесуваа:

0,84 - 1,96 g/L за Apo A-1,

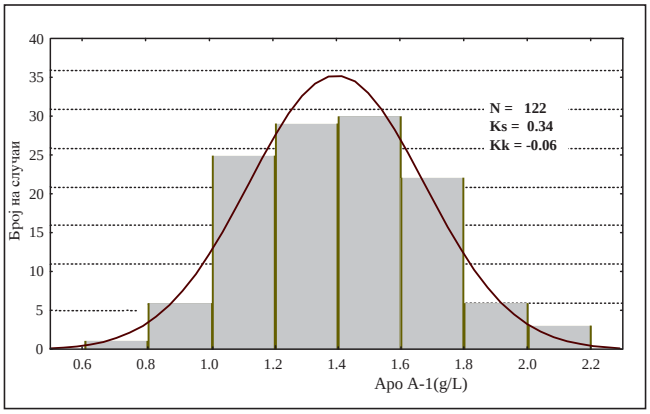
0,51 - 1,43 g/L за Apo B,

0,37 - 1,05 за Apo B/Apo A-1 соодносот.

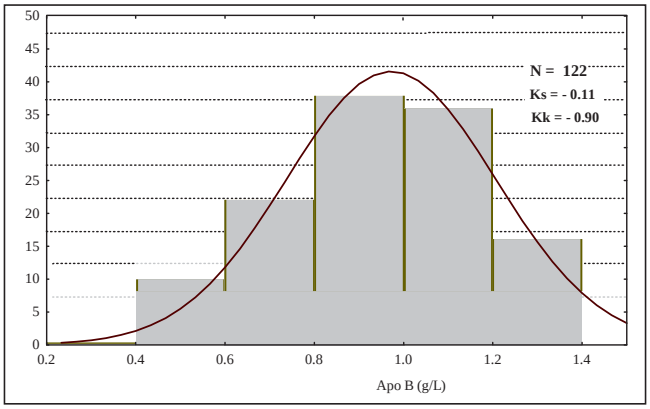
Референтните интервали за овие три параметра не беа стандардизирани според возраста, заради малиот број испитаници во одделни возрасни групи.

Аполипопротеините A-1 и B се наоѓаат во фокусот на поновите истражувања, со оглед на фактот што резултатите од голем број проспективни студии покажаа дека Apo A-1, Apo B и нивниот сооднос Apo B/Apo A-1 се супериорни параметри за процена на ризикот од коронарна артериска болест, во споредба со останатите липидни и липопротеински параметри.

Што се однесува до референтните интервали за Apo A-1 и за Apo B, како и Apo B/Apo A-1 соодносот, во литературата се среќаваат различни податоци, бидејќи тие зависат од географската локација, а разлики постојат исто така и поради различниот број испитаници како и поради разликите во употребениот метод. Резултатите од нашето испитување ние ги споредивме со резултатите од студиите на европската популација (13,17,18,19,20). Нашите резултати делумно се совпаѓаат со резултатите добиени со испитување на шведската популација (17), што се должи на тоа што оваа шведска студија вклучува огромен број испитаници (N=147576). Студијата покажа дека кај шведската популација постои разлика меѓу двата пола за серумските концентрации на Apo A-1 и на Apo B, што ние не ја докажавме. Во поглед на влијанието на возраста врз серумските концентрации на Apo A-1 и на Apo B, резултатите од оваа студија покажаа дека кај возрасни индивидуи концентрацијата на Apo A-1 и кај двата пола незначително се менува со возраста, додека вредностите на



Слика 1. Дистрибуција на вредностите на Apo A-1



Слика 2. Дистрибуција на вредностите на Apo B

Apo B се зголемуваат с□ до возраст од 60 години кај мажите, односно до 70 години кај жените.

Добиените граници на референтни вредности за Apo A-1 и за Apo B во нашето испитување (0,84 - 1,96 g/l за Apo A-1 и 0,51 - 1,43 за Apo B) се слични со оние определени на француска популација (1,04 - 2,24 g/l за Apo A-1 и 0,43 - 1,39 g/l за Apo B), како и со резултатите од испитување на финската популација (19,20). Резултатите од испитувањето на популацијата во Финска, за разлика од нашите, покажаа разлики меѓу мажите и жените во поглед на средните вредности за Apo A-1 и за Apo B.

Што се однесува до референтните вредности за Apo B/ApoA-1 соодносот, во литературата се среќаваат мал број податоци за референтните интервали за овој сооднос (23). Во оваа студија утврдени се средни вредности за Apo B/Apo A-1 соодносот од 0,56 до 0,70. Нашите резултати за средните вредности на Apo B/Apo A-1 соодносот (0,71) се блиски со оние од споменатата студија.

Со оглед на значењето на Apo A-1, Apo B и Apo B/ Apo A-1 соодносот, како супериорни параметри за процена

на ризикот од коронарна артериска болест, одделни поголеми лаборатории во светот, паралелно со определувањето на референтните интервали за овие параметри, ги определиле и т.н. пресечни точки (cut off points), односно концентрациите поврзани со зголемен ризик од коронарна артериска болест (19,23). Така, на пример, Contois и сор. (24), врз основа на испитување на општата популација во Соединетите Американски Држави, ја утврдиле концентрацијата 1,20 g/l како пресечна точка (cut off) за Apo A-1 и Apo B, што значи дека концентрациите на Apo A-1 пониски од 1,20 g/l и концентрациите на Apo B повисоки од 1,20 g/l ќе претставуваат основа за идентификација на лица со зголемен ризик за коронарна артериска болест. Вакви тестирања во наши услови с уште не се правени.

Заклучок

Како заклучок на досега изнесеното, може да се каже дека во нашето испитување определени се референтните интервали за Apo A-1, за Apo B и за Apo B/Apo A-1 сообносот кај здрава македонска популација, со употреба на стандардизиран, мануелен имунотурбидиметриски метод и едноставна апаратура, достапна за секоја лабораторија. Како цел на нашите понатамошни испитувања си поставивме стандардизирање на референтните интервали за овие три параметра според возраста и определување на пресечните точки (cut off points) за овие три параметра што ќе придонесе за подобро толкување на добиените резултати во клиничката практика.

Литература

1. N.J. Wald et al., *Lancet* **343**, 75-79 (1994).
2. M.S. Graziani et al., *Clin. Chem.* **44**, 134-40 (1998).
3. H. Kukita, M. Hamada, K. Hiwada and T. Kokubu, *Atherosclerosis* **55**(2), 143-9 (1985).
4. M. Haidari, M. Moghadam, M. Chinicar, A. Ahmadieh and M. Doosti, *Clin. Biochem*. **34**(2), 149-55 (2001).
5. H. Kukita, K. Hiwada and T. Kokubu, *Atherosclerosis* **51**(2-3), 261-7 (1984).
6. P.P. Jadhav, A.P. Taskar, S.P. Taskar and R.D. Darne, *J. Assoc. physicians. India* **42**, 703-5 (1994).
7. V.K. Bahl, M. Vaswani, D. Thatai and H.S. Wasir, Int. *J. Cardiol*. **46**(2), 143-9 (1994).
8. B. Lamarche et al., *Circulation* **94**, 273-278 (1996).
9. M.J. Stampfer, F.M. Sacks, S. Salvini, W.C. Willett and C.H. Hennekens, *N. Engl. J. Med*. **325**, 373-381 (1991).
10. I.S. Okosun, T.E. Prewitt, Y. Liao and R.S. Cooper, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*. **23**(5), 498-504 (1999).
11. S. Vaisanen, J. Gavert, A. Julkunen, E. Voutilainen and I. Penttila, *Int. J. Clin. Lab. Res*. **23**(3), 160-4 (1993).
12. J. Eugui, M.J. Logrono, R. Ruiz, C. Zugaza, J.L. Mirabel and C. Martinez, *Clin. Biochem*. **27**(4), 310-5 (1994).
13. J.H. Contois et al., *Clin. Chim. Acta*. **295** (1-2), 1-12 (2000).
14. M.I. Kamboh, M. Rewers, C.E. Aston and R.F. Hamman, *Am. J. Epidemiol*. **146** (12), 1011-8 (1997).
15. P.S. Bachorik, K.L. Lovejoy, M.D. Carroll and C.L. Johnson, *Clin. Chem.* **43**(12), 2364-78 (1997).
16. J.E. Ferguson et al., *Ethn. Dis*. **7**(3), 250-8 (1997).
17. I. Junger, S.M. Marcovina, G. Waldius, I. Holme, W. Kolar and E. Steiner, *Clin. Chem*. **44** (8 Pt 1), 1641-9 (1998).
18. J. Steinmetz, P. Tarallo, B. Fournier, E. Caces and G. Siest, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem*. **33**(6), 37-42 (1995).
19. A. Leino, O. Impivaara, M. Kaitsaari and J. Jarvisalo, *Clin. Chem*. **41**(11), 1633-6 (1995).
20. J. Steinmetz et al., *Ann. Biol. Clin*. **55** (5), 451-4 (1997).
21. C. Labeur, J. Shepherd and M. Rosseneu, *Clin. Chem.* **36** (4), 591-597 (1990).
22. H.A. Solberg, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem*. **25** (9), 645-656 (1987).
23. E.J. Brunner et al., *Atherosclerosis* **102** (2), 195-207 (1993).
24. J.H. Contois et al., *Clin. Chem*. **42**(4), 489-91 (1996).

Summary

Reference intervals of Apo A-1 , Apo B and Apo B/Apo A-1 ratio in sample of macedonian population

Svetlana Cekovska, Sonja Alabakovska, Katerina Tosheska, Danica Labudovic, Bojana Todorova

Institute of medical and experimental biochemistry, Medical Faculty, Skopje, Macedonia

Key words: Apo A-1, Apo B, Apo B/Apo A-1 ratio, immunoturbidimetric assay, reference intervals.

The disorders of serum concentration of Apolipoproteins A-1 and B (Apo A-1 and Apo B), as well as of Apolipoprotein B/Apoliporotein A-1 ratio (Apo B/ Apo A-1) are considered to be independent risk factors for coronary heart disease. It is recommended that each laboratory should asign its own reference intervals for Apo A-1 and Apo B, as well as for Apo B/Apo A-1 ratio, as these depend on the geographical location. For this purpose we determined the serum concentration of Apo A-1 and Apo B and we calculated the Apo B/Apo A-1 ratio in 122 healthy individuals from Macedonian population (70 women and 52 men), aged 18-60 years. We used commercial, standardized manual immunoturbidimetric assay (Randox).

The obtained concentrations (x ± SD) were: Apo A-1 = 1.39 ± 0.28 g/l in the female population and 1.42 ± 0.27 g/l in the male population, Apo B = 0.95 ± 0.24 g/l in the female and 1.00 ± 0.23 g/l in the male population. The calculated Apo B/Apo A-1 ratio was 0.70 ± 0.17 in the female subgroup and 0.72 ± 0.18 in the male subgroup. Student's t-test detected no significant difference ($p>0.05$) in mean values for Apolipoproteins A-1 and B and for Apo B/Apo A-1 ratio between female and male subgroups, which lead to the conclusion that division according to sex is not necessary from diagnostic point of view. The Apo A-1 and Apo B concentrations estimated for the mixed group (N=122) were 1.40 ± 0.28 g/l and 0.97 ± 0.23 g/l. The Apo B/Apo A-1 ratio estimated for whole group was 0.71 ± 0.17.

The type of distribution of values for Apo A-1, Apo B and Apo B/A-1 ratio was tested by calculating the values of coefficient of asymetry (Skewness), coefficient of flatness (Kurtosis) and standard deviations of these coefficients. The distribution of values was according to Gaussian curve for all three parameters. Therefore, according to the normal distribution reference intervals for Apo A-1, Apo B and Apo B/Apo A-1 ratio was estimated parametrically (mean ± 2 standard deviations).

Reference intervals for Apo A-1 were 0.84 - 1.96 g/l, 0.51 - 1.43 g/l for Apo B and 0.37- 1.05 for Apo B/Apo A-1 ratio.

Македонски фармацевтски билтен, **47** (1,2) 43-50 (2001)
ISSN 1409 - 8695
UDK: 615.014.8 : 678.743

Стручен труд

Параметри за процена на квалитетот на полиетиленска и на полипропиленска амбалажа и на гумени затворачи наменети за фармацевтски препарати

Лилјана Угринова[1], Анета Димитровска[1]*, Сузана Трајковиќ-Јолевска[1], Тодор Гаврилов[2]

[1]*Институт за испитување и контрола на лекови, Фармацевтски факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј", Водњанска 17, 1000 Скопје, Македонија;* [2]*ОХИС А.Д., 1000 Скопје, Македонија*

Примен март 2001, прифатен март 2002

Апстракт

Направен е преглед на параметрите за процена на квалитетот на полиетиленска и на полипропиленска амбалажа и на гумени затворачи наменети за фармацевтски препарати. За процена на квалитетот на испитуваниот материјал беа извршени физички, хемиски и биолошки испитувања според постапките дадени во Ph. Eur., DIN и според DIN ISO стандардите. Барањата за квалитет на овој вид амбалажа пропишани според Ph. Eur., DIN и DIN ISO стандардите се разликуваат во однос на предвидените параметри за физички, за хемиски и за биолошки испитувања. Исто така, пропишани се и различни граници на дозволено отстапување на одделни параметри.

Клучни зборови: полиетиленска и полипропиленска амбалажа; гумени затворачи; фармацевтски препарати, процена на квалитет

Вовед

Европската фармакопеа (1) пластичната амбалажа наменета за фармацевтски препарати ја дефинира како пластичен производ што содржи или треба да содржи фармацевтски препарат и е или може да биде во директен контакт со него. Затворачот е дел од амбалажата.

Материјалот од кој е направена пластичната амбалажа за фармацевтска употреба, во својот состав не смее да содржи супстанции што можат да бидат екстрахирани од содржината на амбалажата во количина што може да ја промени ефикасноста и стабилноста на фармацевтскиот препарат или да ја зголеми неговата токсичност. Одржувањето на квалитетот на лекот во голем дел зависи и од квалитетот на затворачот и од начинот на затворање.

Полиетиленот (PE) со ниска и со висока густина и полипропиленот (PP) главно се користат за производство на шишиња наменети за амбалажа за водени раствори за интравенски инфузии. Тие се лесни, флексибилни, некршливи, хемиски инертни, не содржат пластификатори, содржат мал број адитиви и не се потполно транспарентни (2).

Гумените затворачи како дел од амбалажата наменета за водени препарати за парентерална употреба, според Европската фармакопеа, се изработуваат од материјали добиени по пат на вулканизација на макромолекуларни органски супстанции (еластомери) со примена на соодветни адитиви. Еластомерите се произведуваат од природни или од синтетски супстанции по пат на полимеризација, полиадиција или поликондензација (1, 3).

Целта на оваа студија е да се изврши процена на квалитетот на PE и на PP шишиња за водени раствори за интравенски инфузии, како и на гумените затворачи преку избор на параметри групирани во физички, во хемиски и во биолошки испитувања и да се направи преглед и споредба на параметрите предвидени за испитување и контрола на овој вид амбалажа, пропишани во Ph. Eur., DIN и со DIN ISO стандардите.

* e-mail: aneta.dimitrovska@baba.ff.ukim.edu.mk
tel.: 126 024; faks: 123 054

Експериментален дел

Материјал

– полиетиленско (PE) шише за водени раствори за интравенски инфузии (500 ml), (примерок бр. 1);
– полипропиленско (PP) шише за водени раствори за интравенски инфузии (500 ml), (примерок бр. 2);
– гумени затворачи од природна гума за полиетиленско (PE) шише за водени раствори за интравенски инфузии (500 ml), (примерок бр. 3) и
– гумени затворачи од природна гума за полипропиленско (PP) шише за водени раствори за интравенски инфузии (500 ml), (примерок бр. 4).

Методи

За процена на квалитетот на испитуваниот материјал беа извршени физички, хемиски и биолошки испитувања според постапките дадени во:

– Ph. Eur. 3;
– DIN 53 363-15 - Infusion bags and bottles made of plastic (примерок бр. 1, 2);
– DIN ISO 8871- Elastomeric parts for aqueous parenteral preparations (оваа норма го содржи DIN 58 367 T1/T2) (примерок бр. 3, 4).

Подготовката на пробните раствори и на слепите проби за хемиските и за биолошките испитувања беше вршена според постапката дадена во Ph. Eur. (автоклавирање на: 100 °C, два часа со дестилирана вода за хемиските испитувања на примерок 1 и 2; 110 °C, 30 минути со стерилен, апироген 0,9 % раствор на NaCl за биолошките испитувања на примерок 1 и 2; 121 °C, 30 минути со дестилирана вода за хемиските испитувања на примерок 3 и 4).

Резултати и дискусија

Физички испитувања

Хемиската структура на полимерните молекули (молекулара маса, степен на кристалност, содржина на адитиви) ги определува физичките, хемиските и механичките својства на пластиката, како и отпорноста на температура.

Пропустливоста на пластичната амбалажа како физички параметар е функција од температурата и од дебелината на ѕидот. Со зголемување на температурата, пропустливоста се зголемува, а се намалува со зголемување на ѕидот на амбалажата. Производителите на различна пластична амбалажа наменета за фармацевтски препарати препорачуваат вредност за најмала дебелина на ѕидот на пластичното шише од 0,3 mm, со што со сигурност се обезбедува квалитетот на амбалажата во однос на пропустливоста за гасови, влага и микроорганизми. Добиените вредности за дебелината на ѕидот на пластичните шишиња наменети за амбалажа за водени раствори за интравенски инфузии се движат во дозволените граници пропишани од производителот и укажуваат на квалитетот на пластичната амбалажа. Транспарентноста на пластичната амбалажа за парентерални раствори е од голема важност. Таа треба да овозможи да се забележат сите органолептички промени на растворот, како и присуството на механички онечистувања од органско и од неорганско потекло. Испитуваната амбалажа одговара на параметарот транспарентност, како и на барањата за квалитет на останатите физички параметри пропишани во Ph. Eur. и DIN стандардот (Табела 1).

Резултатите од физичките испитувања на гумените затворачи се дадени во Табела 2. Тврдината на испитуваните гумените затворачи се движи во дозволените граници (45 ± 50 Shore A), пропишани во DIN ISO стандардот. Тврдина по Shore претставува отпор на гумата спрема игла со определено оптоварување. Тврдината е функција од составот на гумената формулација и од условите користени во процесот на производство и може да се искористи како показател кој укажува на степенот на вулканизација.

Испитуваните гумени затворачи за PE и за PP шише (примерок 3 и 4) одговараат и во однос на параметарот пенетрабилност (силата со која перпендикуларот со игла го прободува гумениот затворач не е поголема од 10 N), како и во однос на фрагментацијата, на самозатворањето и на отпорноста на стерилизација, пропишани во соодветните прописи.

Хемиски испитувања

Идентификацијата на основниот полимер, полиетилен и полипропилен, како и на еластомерот во гумените затворачи беше извршена со примена на IR спектроскопија во споредба со соодветните референтни IR спектри (4). Во гумените затворачи за PE и за PP шише наменети за водени раствори за интравенски инфузии утврдено е присуство на еластомер од полиизопренски тип.

Добиените вредности од хемиските испитувања на PE и на PP примарна амбалажа, како и на гумените затво-

Табела 1. Резултати од физичките испитувања на PE и на PP шише за водени раствори за интравенски инфузии

Испитувани параметри	Резултати		Користени стандарди и дозволени лимити	
	Примерок 1 (PE)	Примерок 2 (PP)	Ph. Eur.	DIN 58363-15
Отпорност на температура, притисок и заталеност	одговара^{DIN}	одговара^{DIN}	/*	- 25 ^{0}C до 50 ^{0}C за време од 24 h; внатрешен притисок: 20 kPa за 10 min.
Отпорност при паѓање	одговара^{DIN}	одговара^{DIN}	/*	Пад од 2 m на цврста подлога
Пропустливост на водена пареа	одговара^{DIN}	одговара^{DIN}	/*	T = 20 ± 5 ^{0}C RH ≤ 60 % за 21 ден; загуба на маса: најмногу 5 % за време на рокот на употреба на препаратот
Транспарентност	одговара Ph.Eur.	одговара^{DIN}	Примарна опалесцен. суспензија (1 во 200)	Примарна опалесцентна суспензија (1 во 100)
Прицврстување на инфузионо шише	одговара^{DIN}	одговара^{DIN}	/*	Делот наменет за прицврстување на шишето треба да издржи сила од 25 N за време од 60 min
Етикетирање	одговара^{DIN}	одговара^{DIN}	/*	Етикетата треба да остане јасно читлива и не смее да се одлепи ако инфузионото шише се потопи во вода за време од 24 h на T= 20 ± 1 ^{0}C
Изглед	одговара	одговара	Интерна спецификација	
Димензии	одговара	одговара	Интерна спецификација	
Маса на празно шише	28 g (дозв. од 27-29 g)	30,5 g (дозв. од 28,5-1,5g)	Интерна спецификација	
Дебелина на сидот (mm)	0,76 (дозв. мин. 0,3)	0,65 (дозв. од 0,35-0,90)	Интерна спецификација	

n = 6;
/*- параметарот не е пропишан за испитување

рачи (Табела 3 и 4) се движат во дозволените граници пропишани со соодветните спецификации за квалитет.

Барањата за квалитет на PE и на PP амбалажата, како и на гумените затворачи пропишани според Ph. Eur., DIN и ISO стандардите, се разликуваат во однос на одделни параметри предвидени за физичките и за хемиските испитувања. Исто така, пропишани се и различни граници на дозволено отстапување на одделни параметри.

Физичките испитувања на пластични шишиња за водени раствори за интравенски инфузии не се пропишани во барањето за квалитет регулирано со прописите на Ph. Eur. Од хемиските испитувања Ph. Eur. не пропишува испитување на присуство на тешки метали кај овој вид примарна пластична амбалажа за разлика од DIN и од DIN ISO стандардите кои пропишуваат испитување на те-

Табела 2. Резултати од физичките испитувања на гумени затворачи наменети за PE и за PP шише

Испитувани параметри	Резултати		Користени стандарди и дозволени лимити	
	Примерок 3 (PE)	Примерок 4 (PP)	Ph. Eur.	DIN ISO 8871
Тврдина ^{0} Shore A	43 DIN ISO	42 DIN ISO	/*	45± 5 ^{0} Shore A
Пенетрабилност (N)	3,2 Ph. Eur.	9,83 Ph. Eur.	Силата потребна да се продупчи затворачот со хиподермална игла со дијаметар од 0.8 mm, треба да изнесува најмногу до 10N	/*
Фрагментација	одговара Ph. Eur.	одговара Ph. Eur.	Најмногу 5 честички≤50 μm видливи со голо око	/*
Самозатворање	одговара Ph. Eur.	одговара Ph. Eur.	Создадените отвори, кога гумениот затворач се продупчува 10 пати со хиподермална игла со дијаметар 0,8 mm, треба потполно да се затворат	/*
Отпорност на стерилизација	одговара DIN ISO	одговара DIN ISO	/*	Затворачот не смее да ги промени своите физички, хемиски и биолошки својства, ако постапката на автоклав. (121 ^{0}C, 30 min) се повтори неколку пати
Изглед	одговара	одговара	Интерна спецификација	
Димензии	дијаметар: 29,0 mm висина: 5,0 mm (дозв. отст. ± 0,2 mm)	дијаметар: 30,0 mm висина: 5,0 mm (дозв. отст. ± 0,2 mm)	Интерна спецификација	

= 6;
- параметарот не е пропишан за испитување

шки метали изразени преку Pb^{2+} или нивно поединечно определување (AAS), на пример: Ba, Cr, Cu, Pb, Sn, Cd и Al за пластична амбалажа за водени раствори за интравенски инфузии. За разлика од Ph. Eur., DIN стандардот предвидува и испитување на механички онечистувања кај пластични шишиња за водени раствори за интравенски инфузии со точно пропишан број и големина на честичките. Границата за дозволено присуство на растворлив цинк како параметар од хемиските испитувања на гумените затворачи, според Ph. Eur. изнесува 5ppm, а според DIN ISO стандардот 3 ppm; дозволената максимална вредност на апсорбанцијата при хемиското испитување на гумените затворачи изнесува според Ph. Eur. 0,200, а според DIN ISO стандардот 0,800 итн.

Биолошки испитувања

Биолошките испитувања, покрај физичките и хемиските, претставуваат значаен показател за процена на квалитетот на примарната амбалажа наменета за фармацевтски препарати.

Испитуваната примарна амбалажа, пластични шишиња од PE и од PP за интравенски инфузии, е апирогена, нетоксична, не предизвикува хемолиза на еритроцитите и е непропустлива за микроорганизми.

За утврдување на присуството на пирогени мате-

Табела 3. Резултати од хемиските испитувања на PE и на PP шише за водени раствори за интравенски инфузии

Испитувани параметри	Резултати		Користени стандарди и дозволени лимити	
	Примерок 1 (PE)	Примерок 2 (PP)	Ph. Eur.	DIN 58363-15
Изглед на автоклаватот бистрина/боја	одговара$^{Ph.Eur}$	одговара$^{Ph.Eur}$	Безбоен и бистар раствор	Безбоен раствор, помалку заматен од пропишаната референтна суспензија
Ацидитет или алкалитет	одговара$^{Ph.Eur}$	одговара$^{Ph.Eur}$	max. 0,4 ml 0,01 mol/l NaOH или max. 0,8 ml 0,01 mol/l HCl /4 % од деклариран волумен	max. 0,8 ml 0,01 mol/l NaOH или max. 0,8 ml 0,01 mol/l HCl /20 ml
pH (4,0 -7,5) DIN 13098	6,53$^{DIN\ 13098}$	5,63$^{DIN\ 13098}$	/*	/*
Механички онечистувања	одговара^{DIN}	одговара^{DIN}	/*	Честички ≥ 2 μm: max. 200/ml Честички ≥ 5 μm: max. 20/ml
Апсорбанција 220 - 360 nm	0,024$^{Ph.Eur}$ (250 nm)	не окажува$^{Ph.Eur}$	max. 0,200	max. 0,250
Редуктивни материи (mlA- mlSl) 0,002 mol/L $KMnO_4$	0,35$^{Ph.Eur}$	0,65$^{Ph.Eur}$	max. 1,5 ml	max. 3,0 ml
Остаток по испарување (mg/100 ml)	0,13^{DIN}	0,72^{DIN}	/*	5,0 mg/100 ml
Тешки метали (ppm)	Pb: 0,00 Cr: 0,07 Sn: 0,01 Cu: 0,00 Hg: 0,00 ^{DIN}	Pb: 0,00 Cr: 0,08 Sn: 0,01 Cu: 0,01 Hg: 0,00 ^{DIN}	/*	1. Pb^{2+}: 1,6 ppm 2. AAS Ba, Cr, Cu, Pb: 1 ppm Sn, Cd: 0,1 ppm Al: 0,01 ppm

n = 6;
/*- параметарот не е пропишан за испитување

рии од немикробно потекло, кои најчесто потекнуваат од материјалот за амбалажа, е предвиден пирогениот тест (5). Пластичните маси се инертни и не покажуваат токсичен ефект ако полимеризацијата на мономерот е потполна. Доколку крајниот продукт не е добро прочистен може да содржи појдовна супстанција или додадени адитиви кои хемиски не се врзале за полимерот. Мономерите, пластификаторите, стабилизаторите, катализаторите, полнителите и други адитиви, како молекули со мала молекуларна маса, може лесно да мигрираат во растворот и да предизвикаат токсичен ефект. Причина за токсичност може да биде и лепакот и печатарските бои од етикетата, ако мигрираат во растворот. Покрај мономерот и адитивите и присуството на калајот како онечистување може да доведе до хемолиза на еритроцитите (6). Од овие причини, за процена на квалитетот на пластичната амбалажа се изведуваат тестот на абнормална токсичност и тестот на хемолиза. Пластичната амбалажа не смее да биде пропустлива за микроорганизми. Продорот на микроорганизми се спречува преку соодветна заталеност и дебелина на ѕидот на пластичната амбалажа. Параметарот пропустливост на микроорганизми беше испитуван со примена на тест микроорганизмот Bacillus subtilis вариетет Niger NCTC 10073.

Во прописите на Ph. Eur. не се пропишани биолошките испитувања за процена на квалитетот на пластични шишиња за водени раствори за интравенски инфузии, за разлика од DIN стандардот.

Заклучок

Барањата за квалитет на PE и на PP амбалажа наменета за фармацевтски препарати и на гумените зат-

Табела 4. Резултати од хемиските испитувања на гумени затворачи наменети за PE и за PP шише

Испитувани параметри	Резултати		Користени дозволени стандарди и лимити	
	Примерок 3 (PE)	Примерок 4 (PP)	Ph. Eur.	DIN ISO 8871
Изглед на автоклаватот	одговара[Ph.Eur]	одговара[Ph.Eur]	Бистрина: референтна суспензија II. Боја: референтен раствор GY_5	Бистрина: референтна суспензија II. Боја: референтен раствор GY_5
Ацидитет или алкалитет	одговара[Ph.Eur]	одговара[Ph.Eur]	max. 0,3 ml 0,01 mol/L NaOH или max. 0,8 ml 0,01 mol/L HCl /20 ml	max. 0,5 ml 0,01 mol/L NaOH или max. 0,5 ml 0,01 mol/L HCl /20 ml
Апсорбанција 220 - 360 nm	0,05[Ph.Eur] (272 nm)	0,08[Ph.Eur] (272 nm)	max. 0,200	max. 0,800
Редуктивни материи (mlA- mlSl) 0,002 mol/L $KMnO_4$	1,7[Ph.Eur]	1,9[Ph.Eur]	max. 3,0 ml/20 ml	max. 3,0 ml/20 ml
NH_4^+ (ppm)	одговара[Ph.Eur]	одговара[Ph.Eur]	2 ppm	2 ppm
Cl^- (ppm)	одговара[DIN ISO]	одговара[DIN ISO]	/*	4 ppm
Остаток по испарување (mg/50 ml)	0,17[Ph.Eur]	0,12[Ph.Eur]	2,0 mg/50 ml	2,0 mg/50 ml
Испарливи сулфиди (mg Na_2S/ 20 cm^2)	одговара[Ph.Eur]	одговара[Ph.Eur]	max. 0,05 mg	max. 0,05 mg
Растворлив цинк (ppm)	1,16 [Ph.Eur]	1,16 [Ph.Eur]	5 ppm	3 ppm
Тешки метали (ppm)	Pb: 0,00 Cd: 0,00 (DIN 58367/2)	Pb: 0,00 Cd: 0,01 (DIN 58367/2)	Pb^{2+}: 2 ppm	Cd: 1 ppm (DIN ISO 8871) Pb: 1 ppm (DIN 58367/2)

n = 6; /*- параметарот не е пропишан за испитување

ворачи се регулирани со прописите на Ph. Eur., DIN и ISO стандардите. За целосна процена на квалитетот на овој вид амбалажа, спецификацијата за квалитет треба да ги обедини параметрите дадени во Ph. Eur., DIN и DIN ISO стандардите, како и да ги усогласи границите на дозволеното отстапување на одделни параметри.

Литература

1. *European Pharmacopoeia*, 3rd Edition, Council of Europe, Strasbourg, 1997
2. A. Kenneth, L. Herbert, L. Leon, P*harmaceutical Dosage Form: Parenteral Medications*, Part 10: Use of Plastics for parenteral packaging, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York, 1992, pp 393- 433.
3. A. Kenneth, L. Herbert, L. Leon, *Pharmaceutical Dosage Form: Parenteral Medications*, Part 11: Elastomeric Closures for Parenterals, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York, 1992, pp 464 - 471.
4. Hummel/Scholl, *Infrared Analysis of Polimers, Resins and Additives An Atlas, Wiley-interscience*, A Division of John Wiley & Sons, Inc., New York, London, Toronto, 1969.
5. K. Richter, W. D. Grahlow and R. Wigert, *Acta Biol. med. Ger*., **39**: 2-3, 277-280 (1980).
6. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Chapter 85: Plastic Packaging materials, 19th edition, MackPublishing company, Easton, Pennsylvania, 1995, pp 1487 - 1493.

Табела 5. Резултати од биолошките испитувања на PE и на PP шише наменети за водени раствори за интравенски инфузии

примерок бр.	пироген тест DIN	тест на абнормална токсичност DIN	пропустливост на микроорганизми DIN	хемолиза (%) DIN (дозв. најмногу 10%)					
				I кивета	контролна кивета I	Δ%	II кивета	контролна кивета II	Δ %
1	одговара	одговара	одговара	10,52	17,36	6,84	57,14	60,81	3,66
2	одговара	одговара	одговара	12,43	17,36	4,93	53,52	60,81	7,2

Користени стандард			
DIN 58363-15	Ph. Eur.		
Најмногу 10% хемолиза	/*	Тест на хемолиза	
Амбалажата треба да биде апирогена	/*	Пироген тест	
Амбалажата треба да биде нетоксична	/*	Тест на абнормална токсичност	
Амбалажата не треба да биде пропустлива за микроорганизми	/*	Пропустливост на микроорганизми	
Амбалажата не смее да предизвика промени на клетката	/*	Цитотоксичност	

/* - параметарот не е предвиден за испитување во соодветниот пропис

Summary

Parameters for the evaluation of the quality of polyethylene andpolypropiylene containers and rubber stoppers for pharmaceutical preparations

Liljana Ugrinova[1], Aneta Dimitrovska[1], Suzana Trajkovic-Jolevska[1], Todor Gavrilov[2]

[1]*Institute of Drug Quality Control, Faculty of Pharmacy, Sts. Cyril and Methodius University, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, Macedonia*
[2]*OHIS A.D., 1000 Skopje, Macedonia*

Key words: polyethylene and polypropylene containers, rubber stoppers, pharmaceutical preparations, evaluation of the quality

An overview of the parameters for the evaluation of the quality of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) containers and rubber stoppers for pharmaceutical preparations is made. For the evaluation of the quality of the material in question, physical, chemical and biological examination were conducted according to the steps outlined in Ph. Eur., DIN and DIN ISO standards. The requirements for the quality of the PE and PP containers and rubber stoppers regulated by Ph. Eur., DIN and ISO standards differ in the required parameters for physical, chemical and biological examination. There also exist different ranges of tolerance for certain parameters.

IN MEMORIAM

м-р фарм. РАДМИЛА БОЈКОВСКА

Со голема почит и љубов се сеќаваме на нашата колешка Радмила.

М-р Радмила Бојковска е родена 1922 година во Куманово. Основното и средното (гимназиско) образование ги завршила во Куманово, а Фармацевтскиот факултет во Белград, Југославија. По дипломирањето, како високостручен кадар била распределена да работи во Гевгелија и да ја организира аптекарската служба во градот и во околината. Подоцна работела во Градскиот хигиенски завод-Скопје. Стручно се усовршила завршувајќи ја специјализацијата од подрачјето на хигиената на исхраната.

Како вреден и совесен работник со високи човечки и морални квалитети, во својот работен век работела на повеќе стручни и одговорни функции: главен санитарен инспектор на градот Скопје, главен републички санитарен инспектор и др. Со посебен интерес и љубов кон струката, м-р. Бојковска ги извршуваше задачите кои се однесуваа на состојбата со квалитетот на лековите и на лековитите суровини и ги следеше сите современи трендови во фармацијата во целост.

М-р Бојковска редовно ги следеше и ги посетуваше сите стручни фармацевтски манифестации и во рамките на своите можности придонесуваше за развојот на фармацевтската струка во Македонија. Беше редовен учесник на годишните средби на Македонското фармацевтско друштво.

За своите работни залагања има добиено голем број пофалници и признанија и остави сеќавања за почит.

м-р фарм. Надежда Келкоцева

УПАТСТВО ЗА АВТОРИТЕ

Македонскиот фармацевтски билтен е официјално гласило на Македонското фармацевтско друштво. Во списанието се објавуваат оригинални научни трудови, куси соопштенија, ревијални трудови и стручни трудови од сите фармацевтски дисциплини и сродни подрачја на работа кои се од интерес за фармацијата (фармацевтска и медицинска хемија, имунологија со имунохемија, молекуларна биологија, фармацевтски анализи, контрола на лекови, фармацевтска технологија, фармакоинформатика, биофармација, фармакологија, применета ботаника, фармакогнозија, токсикологија, клиничка фармација, храна и исхрана, физичка фармација, органски синтези, социјална фармација, историја на фармација и др.).

Во Македонскиот фармацевтски билтен се објавуваат и други прилози (пораки и соопштенија, извештаи и календари на научни и на стручни манифестации во земјата и во странство, прегледи на книги). Составен дел на Билтенот се и разни рубрики.

Оригиналните научни трудови ги содржат резултатите на сопствени, дотогаш необјавени научни истражувања кои претставуваат заокружена целина, а даваат придонес кон развојот на соодветната научна област. Бројот на страниците (заедно со сликите и со табелите) не треба да биде поголем од 15.

Кусите соопштенија содржат резултати од научни истражувања презентирани во помал обем, чиј број на страници не треба да биде поголем од пет (дозволени се една табела и една слика).

Прегледите се пишуваат на покана од Уредувачкиот одбор, а претставуваат поопширен приказ на истражувањата и сознанијата на повеќе автори во определена научна област, за која компентноста на авторот на прегледот е потврдена преку неговите објавени истражувања.

Стручните трудови известуваат за корисни резултати кои овозможуваат податоците од оригиналните научни истражувања да бидат применети во практичната работа. Стручните трудови можат да се темелат и на обработка на теоретски податоци. Бројот на страниците (заедно со сликите и со табелите) не треба да биде поголем од 10.

Оригиналните научни трудови, кусите соопштенија и прегледите треба да бидат напишани на англиски јазик, додека стручните трудови и сите останати прилози можат да бидат напишани и на македонски јазик.

Прифаќањето на трудовите за печатење во Билтенот ги обврзува авторите истите резултати да не ги објавуваат во друго списание.

Подготовка на ракопис:

Ракописите треба да се достават во три примероци испечатени на компјутерски печатач, едностранo со проред од 1,5 со маргина од 3,0 cm од секоја страна, на хартија со формат А4 на адреса на главниот уредник:

Доц. д-р Светлана Кулеванова
Фармацевтски факултет,
Водњанска 17, 1000 Скопје,
Република Македонија

Страниците и прилозите треба да бидат нумерирани.

При подготвување на ракописот за печатење треба да се води сметка тој да биде максимално концизен, без непотребни повторувања.

При пишување на ракописот задолжителна е употреба на следните единици за: должина (m, cm, mm, mm, nm, Å); маса (kg, g, mg, mg, ng, pg); волумен (l, ml, ml); време (s, min, h, d); температура (^oC, K); радијација (Bq, Ci, dpm, Gy, rad): концентрација (M, mol/l, N, mg/ml, %, %(v/v), %(w/v), ppm).

Имињата на супстанциите треба да се во согласност со препораките и правилата дадени од IUPAC или, ако такви не постојат, според практиката на Chemical Abstracts.

Табелите и сликите (фотографии, дијаграми и скици), како и структурните формули треба да бидат дадени секоја на одделен лист (во текстот да е обележано нивното место). Табелите и сликите се нумерираат со арапски бројки (на пр. Табела 1., Сл.1).

Ракописот треба да содржи: наслов, апстракт, клучни зборови, вовед, експериментален дел, резултати и дискусија, заклучок, благодарност (по потреба), литература и резиме.

На **насловната страница** треба да стои насловот на ракописот. Во посебни редови треба да стои полно име и презиме на авторите, назив и адреса на институцијата на авторите. Кога авторите потекнуваат од повеќе различни институции треба да се означи потеклото на секој автор со ^{1,2,3}.... на крајот од неговото име. Со ѕвездичка треба да биде означено името на авторот за коресподенција. Во долниот лев агол од насловната страница се наведува неговата e-mail адреса, телефонскиот број и број на факс.

Апстрактот треба да биде до 250 збора (научни и стручни трудови), односно до 100 збора (куси соопштенија), а треба да ги содржи целта на работата, методологијата и позначајните резултати. Во продолжение треба да бидат застапени три до шест клучни збора распоредени според редоследот на важност.

Во **воведниот дел** треба накусо да се наведат само најважните податоци од поранешните истражувања поврзани со обработуваната проблематика и да се објасни целта и важноста на работата.

Експерименталниот дел треба да биде издвоен и да содржи податоци за употребуваните материјали и опис на применетите методи на начин што ќе овозможи репродуцирање на постапката, но без детално опишување на веќе познатото.

Трудовите што се однесуваат на теоретски истражувања, наместо експериментален дел треба да имаат соодветно поглавје со поднаслови во кое ќе бидат изнесени подробности неопходни за проверка на презентираните резултати.

Резултатите и дискусијата треба да бидат дадени во едно поглавје. Дискусијата треба да содржи анализа на резултатите и на заклучоците што притоа можат да се извлечат.

Заклучокот што произлегува од изложените резултати и дискусија се издвојува во посебно поглавје.

Литературата се наведува во посебно поглавје, при што библиографските единици се нумерираат по оној ред по кој се појавуваат во текстот. Ако во текстот се спомнуваат автори, се наведуваат само презимињата на авторите (ако ги има еден или два), а во случај на повеќе автори се пишува, на пример, *Vetter et al.* (1).

Статии од научни списанија се цитираат на овој начин:

1. P. Premov and D. Dulanov, *Maced. Pharm. Bull.*, **20**, 2-10 (2000).

Кратенките на списанијата се наведуваат според *Chemical Abstracts.*

Книги се цитираат на овој начин:

2. A. Robert, M. Sporn, *Progress in Organic Chemistry,* 3rd ed., Butterworths Scientific Publications, London, 1998, pp 125-154.

Книги со уредник:

3. J. Cook, in *The retinoids,* P. Cornwell, Ed., Academic Press, Orlando, 1996, pp 25-29.

Трудовите напишани на англиски јазик на крајот треба да содржат **резиме** на македонски јазик. Резимето треба да содржи наслов, полно име и презиме на авторот/авторите, назив на институцијата на авторот/авторите, клучни зборови и текстот на апстрактот. Стручните трудови напишани на македонски јазик на крајот треба да содржат резиме напишано на англиски јазик во кое треба да се вклучени истите податоци.

Примените ракописи Уредувачкиот одбор ги испраќа на рецензирање. Рецензираните трудови, заедно со евентуалните забелешки и мислења на Уредувачкиот одбор, се доставуваат до авторите. Тие се должни најдоцна во рок од 30 дена да ги извршат неопходните корекции и финалната верзија на ракописот да ја достават до Уредувачкиот одбор во печатена форма и задолжително и на *PC* форматирана дискета **(Word; Times New Roman, Mac C Times, Macedonian Times** и големина на букви **11).**

Авторите добиваат 20 бесплатни сепарати од секој труд објавен во Билтенот.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Macedonian Pharmaceutical Bulletin is an official publication of the Macedonian Pharmaceutical Association. The journal publishes original scientific papers, short communications, reviews and professional papers from all fields of pharmacy and corresponding scientific fields of interest for pharmacy (pharmaceutical and medicinal chemistry, immunology and imunochemistry, molecular biology, pharmaceutical analyses, drug quality control, pharmaceutical technology, pharmacoinformatics, biopharmacy, pharmacology, applied botany, pharmacognosy, toxicology, clinical pharmacy, food and nutrition, physical pharmacy, organical synthesis, social pharmacy, history of pharmacy etc.).

The Macedonian Pharmaceutical Bulletin, also, publishes and other contributions (recommendations and announcements, reports of meetings, important events and dates, book reviews, various rubrics).

Original scientific papers should contain own unpublished results of completed original scientific research. The number of pages (including tables and figures) should not exceed 15.

Short communications also should contain completed but briefly presented results of original scientific research. The number of pages should not exceed 5 (including one table and one figure).

Reviews are written at the invitation of the Editorial Board. They should be surveys of the investigations and knowledge of several authors in a given research area, the competency of the authors of the reviews being assured by their own published results.

Professional papers report on useful practical results which are not original but help the results of the original scientific research to be adopted into practical use. Professional papers might be based on the elaborating of theoretical data. The number of pages should not exceed 10 (including tables and figures).

Original scientific papers, short communications and reviews should be written in

English, while professional papers and all other contributions may be submitted in Macedonian.

Acceptance for publication in the Bulletin obliges the authors not to publish the same results elsewhere.

Preparation of manuscripts:

Manuscripts should be submitted in triplicate, typed (1 ½ spaced) on A4 paper with margins of 3.0 cm on each side. It is recommended the manuscript be sent on the Editor-in-Chief address's:

Prof. dr. Svetlana Kulevanova
Faculty of Pharmacy
Vodnjanska 17
1000 Skopje
Republic of Macedonia

The pages and appendices should be numbered.

The papers should be written in the shortest possible way and without unnecessary repetition.

Obligatorily, only the follow quantities and units must be used: length (m, cm, mm, mm, nm, Å); weight (kg, g mg, mg, ng, pg); volume (l, ml, ml); time (s, min, h, d); temperature (oC, K); radiation (Bq, Ci, dpm, Gy, rad); concentration (M, mol/l, N, mg/ml, %, %(v/v), %(w/v), ppm).

The names of substances should be in accordance with the IUPAC recommendations and rules or Chemical Abstracts practice.

Figures (photographs, diagrams and sketches) and structural formulae should each be given on a separate sheet (the place to which they belong in the text should be indicated). The tables and the figures should be numbered in Arabic numerals (e.g. Table 1, Fig. 1).

Manuscript should contain: title, abstract, key words, introduction, experimental, results and discussion, conclusion, acknowledgment (if desired) references and summary.

Papers should be preceded by a title page comprising: the title, the complete name(s) of the authors, and the author's affiliations (institution and address). When the authors affiliated from various different institutions the origin of the each author should be indicated with 1,2,3... at the end of his name. The correspodence author should be indicated with * and his e-mail address, telephone and fax number to be supplied in the bottom left part of the title page.

Each paper must begin with an Abstract which should not exceed more than 250 (original scientific and professional papers) or 100 (short communications) words. The abstract should include the aim of the research, methods and the most important results. A list of 3 to 6 key words arranged in the order according to their importance should follow the abstract.

In the introduction only the most important previous results related to the problem in hand should be briefly reviewed and the aim and the importance of the research should be stated.

The experimental section should be written as a separate section and should contain a description of the materials used and methods employed in form which makes the results reproducible, but without detailed description of already known methods.

Manuscripts which are related to theoretical studies, instead of experimental, should contain a sub-heading and the theoretical background where the necessary details for verifying the results obtained should be stated.

It is often advantageous to combine Results and Discussion in one section. The discussion should contain an analysis of the results and the conclusions that can be drawn.

Conclusion which is in consequence from the presented results and discussion should be given in the separate section.

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. References should be numbered in the order in which they appear in the text and listed in numerical order in the reference list.

The surname of one or two authors may be given in the text, whereas in the case of more than two authors they should be quoted as, for example *Vetter et al.* (1).

Papers from scientific journals should be cited as follows:

1. P. Premov and D. Dulanov, *Maced. Pharm. Bull.* **20**, 2-10 (2000).

The names of journals should be abbreviated as in Chemical Abstracts.

Books should be cited as follows:

2. A. Robert, M. Sporn, *Progress in Organic Chemistry*, 3 rd ed., Butterworths Scientific Publications, London, 1998, pp 125-154.

Books with editor:

3. J. Cook, in *The retinoids,* P. Cornwell, Ed., Academic Press, Orlando, 1996, pp 25-29.

Manuscripts written in English should contain a summary in Macedonian at the end of the paper. The summary should contain: title, author(s) full-name(s), surname(s), author's affiliations (institution and address), key words and abstract. Professional papers written in Macedonian should contain a summary in English in which the same data should be included.

Papers received by the Editorial Board are sent to referees. The suggestions of the referees and Editorial Board are sent to the author(s) for further action. The corrected text should be returned to the Editorial Board as soon as possible but in not more than 30 days in a hard copy form and obligatorily on the PC formatted disk (**Word; font Times New Roman, Mac C Times, Macedonian Times** and size **11**).

Twenty reprints of each paper are supplied free of charge to the author(s).